

00551

2



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

“Efecto de la tensión de oxígeno disuelto constante en la
producción de lactadherina recombinante expresada en el
sistema células de insecto-baculovirus”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

I.B.Q. ROLANDO IVAN ARRONIZ CHAVEZ

Cuernavaca, Mor. Enero 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatorias:

A mi madre, porque gracias a su sacrificio he reconocido su esfuerzo año tras año por lo que a cambio prometí nunca rendirme para no fallarle.

A mi hermano Paco por su apoyo moral en todo momento, cariño, amistad y ayuda.

A mi abuela porque gracias a sus consejos y su rectitud pude salir adelante.

A María, tú has sido nuestra segunda fortaleza después de mi madre, a mi hermano y a mí nos has cuidado con mucha dedicación y apoyo pues nos viste desde pequeños y mira ahora en que nos hemos convertido, gracias nana!

A mi padre y la familia Arróniz, gracias a todos mis primos, tíos y sobrinos por su confianza en mí.

A la familia Medina, gracias por brindarme la mano siempre que la he necesitado en especial mi tía Meche, a quien la estimo mucho.

A mis amigos "Los magníficos" de licenciatura (generación 1995-2000): Anilú, Angélica, Gabriela, Nancy, Edgar, Carmen, Lázaro, Rocío, Matilde, Ana Laura y les doy gracias por haberme levantado los ánimos durante todo este tiempo y sé reconocer que seguiremos siendo amigos por siempre.

A mis amigos de bachillerato (generación 1992-1995): Amado, Patricia, Araceli, Gladys, Rosa, Lorena, Ana y Rosario, aunque nos hemos distanciado de alguna manera no hemos perdido contacto después de tanto tiempo.

A mis nuevos amigos de maestría: Adrián, Vanessa, Jimmy, Argel, Karina, Heber, Antonio Serrato, Monse, Delia Vanessa, Luis, Rubén, Marisol, Boris, César, Jorge, Sara, Bernardo y Juan Manuel.

A mis amigos foráneos: Sebastián, Servando, Javier, Dulce, Mario, Gerardo, Susana, Arturo, Cecilia, Alejandra Camacho, Lupita, Fabiola, Sandra, Bety, Rosalía, Charito, M. en C. Barradas, M. en C. Díaz, Dra. Lupita y Carlos, Víctor, Arcángel, Elvira, Zoila y en especial cariño a mis tres queridas Chiapas girls: Rosibel, Marlene y Alejandra.

A mis compañeros del grupo OTR: Javier, Dra. Meneses, Dra. Palomares, Karín, Roberto, Dr. Estrada y Germán por algunos ratos compartidos.

A mis compañeros del grupo Galindo: Celia, Blanca, Tania, Edith, Dr. Peña, Dr. Serrano, Toño Rocha, Mauricio y Lorena

Agradecimientos:

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, a usted le debo lo que he aprendido durante todo este tiempo, gracias por apoyarme en todo momento y por haber tenido confianza en mí después de tantos tropiezos que tuve este tiempo.

A los miembros de mi comité tutorial, los Doctores Enrique Galindo y Enrique Merino, por sus críticas constructivas que gracias a ellas me ayudaron a desarrollar este proyecto.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis:

Dr. Rafael Vázquez Duhait
Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich
Dra. María Luisa Villarreal
Dr. Edmundo Castillo Rosales
Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

A don Javier porque su apoyo técnico fue excelente durante mi estancia, por lo que jamás tuve quejas con usted. A usted le debo toda su gran ayuda y experiencia, muchas gracias!

A Karín Levy, Vanessa Hernández, Marisol Córdova, Gloria Villa y Nancy Osorio, porque en algún momento siempre necesitaba los servicios que hábilmente saben desempeñar, tanto técnico como administrativo.

Al futuro Dr. Antonio Serrato, amigo, te aprecio mucho porque tu paciencia que depositaste en mí desde mis inicios ayudó a obtener este grado. Tú siempre estabas disponible cuando tenía muchas dudas y te lo agradezco. De alguna manera tu esfuerzo se ha visto recompensado con lo que estás logrando.

A la Dra. Meneses porque siempre ayudaba a responderme varias interrogantes que se presentaban a lo largo de mi maestría, gracias por tu ayuda abeja!

A la unidad de cómputo por sus servicios especializados en sistemas computacionales.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de éste proyecto...¡gracias!

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos 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 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 158811, de los proyectos NC-230 y 133104-B y, de la Dirección General de Asuntos de Posgrado (DGAPA) a través del proyecto IN216100.

Indice

Indice de Figuras		vi
Indice de Tablas		vii
Nomenclatura		ix
Resumen		1
Capítulo 1	Introducción	4
Capítulo 2	Antecedentes	8
2.1	Reseña e interés actual del sistema CI-BV	8
2.2	Ciclo de infección del baculovirus	9
2.2.1	Etapas en el cultivo <i>in vivo</i>	9
2.2.2	Etapas en el cultivo <i>in vitro</i>	12
2.2.3	Expresión de genes heterólogos	13
2.3	Líneas de células de insecto	14
2.4	Baculovirus	15
2.4.1	Clasificación y estructura	15
2.5	Metabolismo de las células de insecto	16
2.6	Efecto del oxígeno disuelto en cultivos de células de insecto	20
Capítulo 3	Objetivos	25
3.1	Objetivo general	25
3.2	Objetivos específicos	25
Capítulo 4	Materiales y Métodos	26
4.1	Línea celular	26

4.2	Virus	27
4.3	Medio de cultivo	27
4.4	Cultivos en suspensión	28
4.4.1	Cultivos en frasco agitado	28
4.4.2.	Diseño del biorreactor	29
4.4.3	Cultivos en biorreactor instrumentado	32
4.4.4	Sistema y programa de control y adquisición de datos	34
4.5	Métodos analíticos	35
4.5.1	Determinación de concentración de células totales y viabilidad celular	35
4.5.2	Determinación de glucosa, glutamina, lactato y sacarosa	35
4.5.3	Cuantificación de la proteína recombinante	38
4.6	Consideraciones matemáticas	39
4.6.1	Cálculo de parámetros cinéticos del cultivo	39
4.6.1.1	Cálculo de la velocidad específica de producción de proteína recombinante	41
4.6.1.2	Cálculo de las velocidades específicas de consumo de sustratos durante la fase de producción	44
4.6.2	Cálculo de parámetros estequiométricos del cultivo	45
4.6.2.1	Cálculo de rendimientos durante la fase de producción	45
4.6.2.1.1	Cálculo para rendimientos de producción de proteína recombinante sobre consumo de sustratos ($Y_{p/glc}$ ó $Y_{p/gln}$)	45
4.6.2.1.2	Cálculo para rendimiento de generación de biomasa sobre consumo de sustratos ($Y_{xv/glc}$ ó $Y_{xv/gln}$) durante la fase de producción	46

	4.6.1.2.3 Cálculo para rendimiento de producción de proteína recombinante sobre generación de biomasa ($Y_{p/xv}$)	46
Capítulo 5	Resultados y discusión	48
5.1	Presentación de resultados	48
5.2	Cultivos control	48
5.2.1	Efecto del oxígeno disuelto en el crecimiento celular	56
5.3	Cultivos infectados	62
5.3.1	Efecto del oxígeno disuelto en el crecimiento celular	71
5.4	Comparación entre los cultivos de células de insecto: infectados y no infectados	79
5.4.1	Efecto del oxígeno disuelto sobre la concentración celular y expresión de la proteína recombinante	79
5.4.2	Efecto del oxígeno disuelto sobre las velocidades específicas de consumo de sustratos y producción de proteína recombinante	86
5.4.3	Efecto del oxígeno disuelto sobre los rendimientos	90
Capítulo 6	Conclusiones	94
Capítulo 7	Perspectivas	96
Capítulo 8	Bibliografía	98
Apéndice A	Técnicas	104
A-1	Determinación del título viral: punto de dilución final ó “end point dilution”	105
A-2	Determinación de sacarosa: hidrólisis por β -fructosidasa	107
Apéndice B	Memorias de cálculo	108
B-1	Cuantificación de proteína recombinante	109

B-2	Cálculo del índice de viabilidad	111
B-3	Cálculo de la velocidad específica de producción de proteína recombinante	112
B-4	Cálculo de la velocidad específica de consumo de glucosa durante la fase de producción	114
B-5	Cálculo de la velocidad específica de consumo de glutamina durante la fase de producción	116
B-6	Cálculo para rendimiento de generación de biomasa sobre consumo de sustrato ($Y_{xv/glc}$ ó $Y_{xv/gln}$)	118
B-7	Cálculo para rendimiento de producción de proteína recombinante sobre generación de biomasa ($Y_{p/xv}$)	119
Apéndice C	Cinéticas completas de cultivos control individuales no mostrados en sección de resultados y discusión	120
C-1	Perfiles cinéticos de cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 3% de oxígeno disuelto	121
C-2	Perfiles cinéticos de cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 20% de oxígeno disuelto	122
C-3	Perfiles cinéticos de cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 160% de oxígeno disuelto	123
C-4	Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes no infectados (controles) realizados en biorreactores	124
C-5	Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes no infectados (controles) realizados en biorreactores	125
Apéndice D	Valores de velocidad específica de crecimiento durante la fase previa a la infección (o antes del cambio escalonado de OD para cultivos control)	126
D-1	Valores de velocidad específica de crecimiento antes de infección	127
Apéndice E	Cultivos infectados	128
E-1	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 0%	129

E-2	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 3%	130
E-3	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 12%	131
E-4	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 20%	132
E-5	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 80%	133
E-6	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 160%	134
E-7	Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores (lote A)	135
E-8	Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores (lote A)	136
E-9	Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores (lote B)	137
E-10	Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores (lote B)	138
Apéndice F	Rendimientos	139
F-1	Rendimientos calculados para $Y_{xv/glc}$ y $Y_{xv/gln}$ en cultivos infectados y sin infectar	140
F-2	Rendimientos calculados para $Y_{p/xv}$, $Y_{p/glc}$ y $Y_{p/gln}$, en cultivos infectados	141

Indice de Figuras

Figura No.

2.1	Ciclo de infección del baculovirus silvestre, <i>AcMNPV</i>	10
2.2	Metabolismo de glucosa y glutamina en células de insecto	17
4.1A	Diagrama del biorreactor, vista 3D	30
4.1B	Diseño del biorreactor, vistas superior e inferior de la tapa	31
4.2	Biorreactor instrumentado de capacidad 300 mL	33
4.3	Diagrama del sistema de cultivo, control y adquisición de datos	36
4.4	Gel típico de poliacrilamida al 10%	39
4.5	Perfil cinético del lote infectado y controlado a 160% de OD	43
5.1	Perfiles cinéticos de cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 3% de oxígeno disuelto	49
5.2	Perfiles cinéticos de cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 20% de oxígeno disuelto	50
5.3	Perfiles cinéticos de cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 160% de oxígeno disuelto	51
5.4	Efecto de diferentes concentraciones de lactato en el pH final del cultivos no infectados y controlados	55
5.5	Cinéticas típicas de las células Sf-9 en lotes no infectados (control) realizados en biorreactores	57
5.6	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 0%	63
5.7	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 3%	64
5.8	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 12%	65
5.9	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 20%	66

5.10	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 80%	67
5.11	Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de oxígeno disuelto a 160%	68
5.12A	Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores	72
5.12B	Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores	73
5.13	Perfil cinético de la concentración de glucosa y sacarosa en cultivos infectados y controlados a 0% de OD	76
5.14	I. Expansión máxima de las células de insecto en cultivos infectados y no infectados. II. Concentración máxima de proteína recombinante producida a diferentes condiciones de oxígeno disuelto.	80
5.15	Efecto del OD sobre la expansión celular máxima de cultivos de CI infectados	82
5.16	Perfil de concentraciones de proteína recombinante expresada en el sistema CI-BV a diferentes condiciones de oxígeno disuelto	84
5.17	Efecto del oxígeno disuelto sobre las diversas velocidades específicas	87
5.18	Efecto del oxígeno disuelto sobre rendimientos: I. Rendimiento biomasa sobre glucosa. II. Rendimiento biomasa sobre glutamina	91
5.19	Efecto del oxígeno disuelto sobre rendimientos: I. Rendimiento de proteína recombinante sobre sustrato. II. Rendimiento de proteína recombinante sobre biomasa.	93

Indice de Tablas

No.		
2.1	Resumen de estudios realizados de OD en células de insecto	24
4.1	Componentes principales del medio SF-900 II.	28

5.1	Datos reportados de coeficientes metabólicos para células Sf-9 sin infectar	88
5.2	Datos reportados de coeficientes metabólicos para células Sf-9 infectadas	89

Nomenclatura

BV	baculovirus
CI	células de insecto
CI-BV	células de insecto - baculovirus
x_v	concentración de células viables
x_{v0}	concentración inicial de células viables en el tiempo cero
x_{vmax}	concentración máxima de células viables
β	constante cinética
K_{O_2}	constante de saturación de oxígeno
α	constante estequiométrica
TCID ₅₀	dosis infectiva en cultivos de tejidos
E	expansión celular
hpi	horas post-infección
$\int x dt$	índice de viabilidad
MDI	multiplicidad de infección
OD	oxígeno disuelto
polh	poliedrina
pr	proteína recombinante
SFB	suero fetal bovino
TDI	tiempo de infección
ufp	unidades formadoras de placa
q_{glc}	velocidad específica de consumo de glucosa
q_{gln}	velocidad específica de consumo de glutamina

q_s	velocidad específica de consumo de sustrato
μ	velocidad específica de crecimiento
q_p	velocidad específica de producción de proteína recombinante
r_{xv}	velocidad volumétrica de producción de biomasa
NPV	virus de poliedrosis nuclear
SNPV	virus de poliedrosis nuclear individual
MNPV	virus de poliedrosis nuclear múltiple
<i>AcMNPV</i>	virus de poliedrosis nuclear múltiple de <i>Autographa californica</i>
$Y_{xv/glc}$	rendimiento de biomasa sobre glucosa
$Y_{xv/gln}$	rendimiento de biomasa sobre glutamina
$Y_{x/s}$	rendimiento de biomasa sobre sustrato
$Y_{p/xv}$	rendimiento de proteína recombinante sobre biomasa
$Y_{p/glc}$	rendimiento de proteína recombinante sobre consumo de glucosa
$Y_{p/gln}$	rendimiento de proteína recombinante sobre consumo de glutamina

Resumen

En la actualidad, el sistema células de insecto-baculovirus es una herramienta poderosa para producir proteínas recombinantes. Algunas de las principales ventajas de este sistema son su facilidad de uso y la capacidad para regenerar altas concentraciones de proteína heteróloga. Un parámetro de gran importancia, pero que en general ha recibido poca atención, es el oxígeno disuelto (OD). Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto del OD controlado a valores constantes sobre los principales parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo de células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante para producir lactadherina, la proteína modelo. Se evaluaron, por duplicado, seis condiciones de oxígeno disuelto constante (0, 3, 12, 20, 80 y 160%) en cultivos de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) infectados y se compararon con cultivos control sin infectar a tres condiciones de oxígeno disuelto constante (3, 20 y 160% OD). Todos los cultivos fueron iniciados con una concentración celular de 0.5×10^6 cel/mL. Durante las primeras horas de cultivo se controló el OD a una concentración de 20%, valor adecuado para alcanzar altas concentraciones de células. Al llegar a una concentración de 1.5×10^6 cel/mL se cambió en forma escalonada el OD a cada una de las 6 concentraciones propuestas. Posteriormente, se infectaron los cultivos a una multiplicidad de infección (MDI) de 1 ufp/cel y se siguió su comportamiento cinético hasta que la viabilidad decayera por debajo del 30%. Se cuantificó la proteína recombinante, glucosa, glutamina, glutamato y lactato. Para los cultivos control se siguió el mismo procedimiento, excepto que después del cambio escalonado no se agregó virus.

PAGINACION DISCONTINUA

Se determinó que por debajo de 20% de OD la expansión celular, definida como la concentración máxima de células vivas entre la concentración de células vivas al momento de infectar (o al momento de hacer el cambio escalonado en OD para los cultivos control) disminuía continuamente hasta ser nula a 0% de OD. Por el contrario, entre OD de 80 y 160% la expansión celular se mantuvo constante. La concentración óptima para proteína recombinante se obtuvo a 80% OD y disminuyó en cultivos mantenidos a OD mayores o menores a 80%. Asimismo, la velocidad específica de producción de proteína recombinante aumentó rápidamente de 0 a $0.3925 \mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{ célula-h}$ al aumentar el OD de 0 a 20%. Entre 20 y 80%, la velocidad específica de proteína recombinante se mantuvo relativamente constante y disminuyó a valores mayores a 80% OD.

Se observó que la velocidad específica de consumo de glucosa en cultivos no infectados se mantuvo constante entre 3 y 160% OD, mientras que fue cero a 0% OD. No se observó una diferencia significativa en el consumo de glutamina entre cultivos infectados y no infectados. Para el cultivo no infectado y controlado a 3% de OD el consumo de glucosa es 2.65 veces mayor al consumo observado en el cultivo infectado. Por otro lado, se observó que la velocidad específica de consumo de glutamina tuvo un perfil similar a lo observado en el consumo de glucosa. No se observaron diferencias significativas entre cultivos infectados y no infectados. En condiciones anóxicas, se observó un incremento de la concentración de la glucosa, debido a la hidrólisis de sacarosa. El lactato, tanto en cultivos infectados como no infectados, se mantuvo relativamente constante durante la fase de crecimiento, excepto para 0% OD donde se incrementó desde el momento de la infección hasta llegar un máximo de 0.55

g/L. La concentración de lactato aumentó durante la fase de muerte en cultivos mantenidos por arriba de 20% OD.

Los resultados obtenidos del presente estudio son importantes para entender el efecto de OD sobre el metabolismo de células de insecto. Tal conocimiento es necesario para establecer condiciones óptimas de producción de proteínas heterólogas por el sistema células de insecto – baculovirus.

Capítulo I

Introducción

Mediante la explotación del cultivo, tanto de células microbianas como animales, se ha logrado la producción de proteínas complejas de importancia en el área médica. A través de los años, se han seleccionado líneas celulares y desarrollado sistemas de expresión capaces de producir proteínas semejantes a las generadas por células humanas. Las células de procariotes ó las de eucariotes inferiores presentan una serie de ventajas desde la perspectiva de un bioproceso. No obstante, la mayoría de estas células no pueden efectuar las modificaciones postraduccionales características de células de eucariotes superiores. Estas modificaciones son esenciales para la función biológica de muchas proteínas recombinantes terapéuticas y profilácticas. Por lo tanto, en ciertas aplicaciones se prefiere el uso de células de eucariotes superiores como sistema de expresión de proteínas heterólogas.

En los últimos 15 años, el sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV) ha generado gran interés ya que ha demostrado ser una herramienta versátil y poderosa para la expresión de genes heterólogos. Entre las ventajas que distinguen al sistema CI-BV se encuentran su alta eficiencia para producir distintas proteínas recombinantes (el 95% de las cuales han sido biológicamente activas), su facilidad para construir virus recombinantes y su inocuidad al ser humano (Lindsay y Betenbaugh, 1992). Además, las células de insecto son capaces de realizar modificaciones postraduccionales, entre ellas la glicosilación, fosforilación y acilación, las cuales determinan las propiedades específicas de cada proteína (Palomares y Ramírez, 1998). El sistema CI-BV, desarrollado a principios de los ochentas por Gale E. Smith en el laboratorio de Max D.

Summers (Smith *et al.*, 1983), se basa en la construcción de baculovirus recombinantes con los que se infectan células de insecto, tanto *in vivo* como *in vitro*. En los baculovirus recombinantes, el gen de interés generalmente reemplaza al gen de la poliedrina, el cual tiene un promotor fuerte que es activado en la fase muy tardía del ciclo de infección. En un baculovirus silvestre, la poliedrina constituye la matriz proteica del cuerpo de inclusión en el que se encuentran embebidos los viriones. La poliedrina protege a los viriones de las condiciones adversas de la naturaleza pero no es esencial para la replicación viral (Caron *et al.*, 1990). Colocando genes heterólogos de productos de interés comercial sobre el control del promotor de la poliedrina se han logrado obtener rendimientos de proteína de 20 a 250 veces mayores que los obtenidos en otras células de eucariotes superiores, tales como las de mamíferos (Bettenbaugh *et al.*, 1999). A partir de datos recopilados por Goosen *et al.* (1992a), el nivel de expresión que se ha logrado obtener de proteína recombinante en el sistema CI-BV varía de entre 1 a 600 mg/L. Inclusive existen trabajos publicados que afirman que la concentración máxima de proteínas recombinantes obtenidas por CI-BV se aproxima a 1 g/L (Maiorella *et al.*, 1988; Caron *et al.*, 1990; Vaughn, 1999; Palomares y Ramírez, 2001; Palomares *et al.*, 2002a).

En el sistema CI-BV, la línea celular más comúnmente usada para producir proteínas recombinantes es la Sf-9, derivada del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. Aunque existen muchos baculovirus, el más utilizado es el virus de la nucleopoliedrosis múltiple de *Autographa californica* ya que tiene un amplio rango de huéspedes e infecta a la mayoría de los lepidópteros.

El cultivo de células Sf-9 en suspensión facilita la producción de las proteínas recombinantes. En todos los sistemas en suspensión, es indispensable mantener una homogeneidad a través de todo el biorreactor para garantizar una disponibilidad adecuada de los

nutrientes necesarios a todas las células. Uno de los nutrientes limitantes que debe ser suplementado a un cultivo de células de insecto, principalmente durante el crecimiento y en las etapas de infección, es el oxígeno. La demanda típica de oxígeno de células de insecto es en general más alta que las de células de mamífero, el cual es usado para mantener las actividades celulares y para acomodar la síntesis de ADN viral y la producción de proteína recombinante (Hu y Bentley, 1999). Además, la demanda de oxígeno se incrementa en casi al doble después de la infección con el virus (Scott *et al.*, 1992, Kamen *et al.*, 1996). Se ha determinado que el intervalo de velocidades de consumo de oxígeno es de 10^{-17} a 10^{-18} mol/célula-s y puede incrementar de un 30% a 100% durante las etapas iniciales de infección (entre 12 y 18 horas post-infección) (Bettenbaugh *et al.*, 1999). Un suministro inadecuado durante la etapa de infección puede afectar negativamente el proceso de replicación viral y disminuir en 5 veces o más los rendimientos de proteína recombinante (Lindsay y Bettenbaugh, 1992). Todo lo anterior señala la importancia que el oxígeno disuelto (OD) tiene sobre el sistema CI-BV.

En este estudio se tomó como proteína modelo a la lactadherina humana, una glicoproteína de 46 kDa que forma parte de un complejo de mucina. Este complejo se encuentra asociado al glóbulo graso de la leche humana. Se ha observado que la lactadherina tiene 4 sitios potenciales de N-glicosilación complejos y que presenta ácido siálico en los heterosacáridos (Couto *et al.*, 1996). Newburg *et al.* (1998), indicando que estos ácidos siálicos compiten con el rotavirus por los sitios de unión a la célula huésped. Hasta la fecha no se ha determinado si la lactadherina presenta actividad terapéutica, pero se le atribuye la propiedad de reducir la intensidad de diarreas provocada por rotavirus en infantes (Yolken *et al.*, 1992). Por lo tanto, la lactadherina representa un modelo interesante que puede tener potencial biotecnológico.

El presente estudio tiene como propósito determinar el efecto del OD constante sobre la producción de la glicoproteína modelo en el sistema CI-BV. Los datos existentes se han enfocado hacia los efectos del OD sobre el crecimiento celular; sin embargo, no hay suficiente información sobre los efectos en la producción de proteínas recombinantes producidas en biorreactores instrumentados donde el OD se controle de forma rigurosa en niveles constantes. Además, pocos reportes relacionan los efectos del OD sobre el metabolismo de las células de insecto infectadas (Reuveny *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos en este trabajo servirán como bases para establecer las condiciones óptimas de OD y para comprender mejor el efecto de tal variable sobre el metabolismo celular después de la infección viral. Dicho conocimiento deberá ser de utilidad en estudios de escalamiento para la producción de proteínas recombinantes por el sistema CI-BV.

Capítulo II

Antecedentes

2.1 Reseña e interés actual del sistema CI-BV

La primer aplicación práctica de los baculovirus se dio como bioinsecticidas en la agricultura. En la década de los cuarentas, a través de extensas pruebas de campo, se probó de manera formal la utilidad de los baculovirus como agentes de control biológico. Fue así como en 1975, se registró el primer baculovirus para ser utilizado comercialmente como pesticida. En la actualidad existen más de 40 baculovirus empleados como biopesticidas, los cuales son usados para proteger miles de hectáreas de diversos cultivos, principalmente hortalizas, árboles frutales y pinos (Maeda, 1995; Miller, 1996). A partir de la década de los sesentas, se generaron las primeras líneas de insecto con el objetivo de propagar el virus *in vitro*. Con los trabajos de Smith *et al.* se abrió en 1983, un área totalmente nueva, en la que al infectar cultivos de células de insecto con baculovirus modificados genéticamente se lograba la expresión de proteínas recombinantes. Actualmente, el sistema CI-BV es uno de los sistemas de eucariotes superiores más utilizados para la producción de proteínas recombinantes a nivel laboratorio. Además, existen proteínas recombinantes comerciales producidas por este sistema y varios productos farmacéuticos se encuentran actualmente en pruebas clínicas (Yamshchikov *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996; Tsao *et al.*, 1996; Palomares y Ramírez, 1998; Palomares *et al.*, 2002a). El sistema CI-BV tiene también grandes perspectivas. Nuevos campos de investigación se están abriendo para este sistema. Por ejemplo, se pueden ahora realizar estudios de bibliotecas de ADN mediante el despliegado de proteínas sobre la superficie viral y la demostración reciente que los baculovirus pueden

internalizarse en células humanas lo cual puede tener impacto potencial en el campo de la terapia génica (Palomares y Ramírez, 2001).

2.2 Ciclo de infección del baculovirus

2.2.1 Etapas en el cultivo *in vivo*

El ciclo de infección del baculovirus en las larvas de insecto inicia cuando los insectos ingieren cuerpos de oclusión provenientes de alimentos contaminados. La matriz poliédrica cristalina (compuesta de poliedrina) que conforma a los cuerpos de oclusión se solubiliza en el tracto intestinal medio en condiciones alcalinas (pH 9.5-11.5 debido a los jugos gástricos del insecto, Granados 1980; Van Lier 1992). La matriz proteica al degradarse libera viriones que se encontraban embebidos en ella. Los viriones entran a las células epiteliales del tracto intestinal medio a través de un proceso de fusión con la membrana plasmática del microvello. La replicación viral se realiza en el epitelio; parte del virus replicado sin cubierta proteica brota de la membrana a la hemolinfa (torrente circulatorio de los insectos). Este virus llamado no ocluido es transportado a través de la hemolinfa a otros tejidos en el insecto para llevar a cabo la infección secundaria. El virus liberado en forma no ocluida puede propagar la infección principalmente en las células epiteliales de los traqueolos, los cuales proveen de oxígeno al tracto intestinal medio (Goosen *et al.*, 1992a, Van Lier *et al.*, 1992; O'Reilly *et al.*, 1994; Palomares y Ramírez 1998; Betenbaugh *et al.*, 1999; Palomares *et al.*, 2002a). El ciclo natural de infección del baculovirus en larvas de insecto se esquematiza en la **Figura 2.1**.

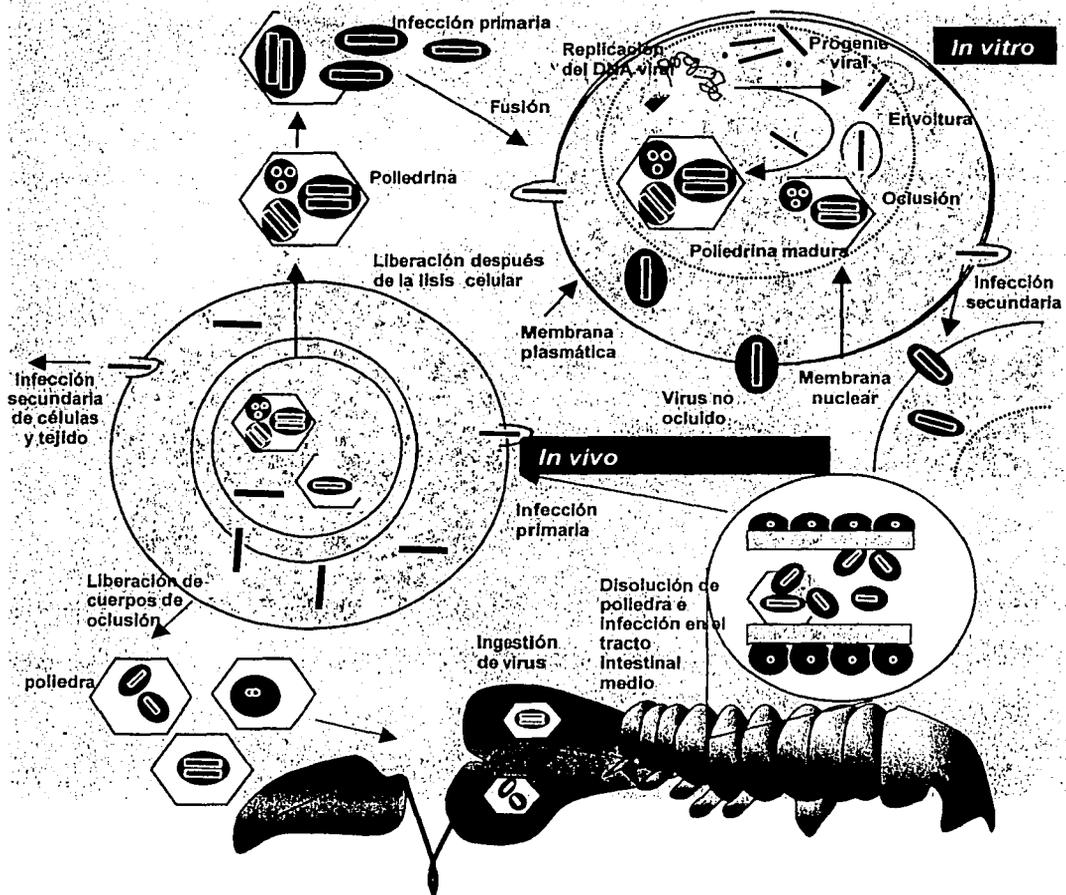


Figura. 2.1 Ciclo de infección del baculovirus silvestre, AcMNPV. La infección primaria a través del virus ocluido inicia a partir de la desintegración de la matriz poliédrica en el intestino del insecto y su subsecuente fusión a la membrana plasmática. Los virus no ocluidos producidos dentro de la célula proceden a iniciar el proceso de infección secundaria. Adaptado de Betenbaugh *et al.* (1999).

Durante una infección típica, la larva infectada continúa alimentándose a lo largo de 5 a 7 días, llegando en la fase terminal a formar un saco cuticular con apariencia lechosa y saturado de cuerpos de oclusión. El insecto cuando se infecta cambia la coloración de su

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cutículo (encafecimiento) y la estructura muscular se desintegra (proceso conocido coloquialmente como marchitamiento). Aproximadamente el 25% del peso seco de la larva destruida es liberado en forma de cuerpos de oclusión. Estos son esparcidos sobre el suelo y plantas, que al ser consumidos por otros insectos inicia de nueva cuenta otro ciclo de infección (O'Reilly *et al.* 1994, Betenbaugh *et al.* 1999).

La expresión de genes a través de baculovirus como el de la núcleo-poliedrosis múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) ocurre en cuatro fases: temprana inmediata (α), temprana (β), tardía (γ) y muy tardía (δ). Durante la fase temprana inmediata, los genes virales son expresados usando factores de la célula huésped. Los productos genéticos de la fase temprana inmediata controlan la expresión de los genes tempranos, cuyos productos son responsables del rearrreglo del citoesqueleto y la dispersión de la cromatina del huésped. La replicación del ADN viral ocurre entre 5-7 horas después de la infección y es seguida por la expresión de los genes tardíos. La fase tardía se extiende a partir de las 6 horas de post-infección (hpi) hasta las 20-24 hpi. En esta etapa ocurre el ensamble de las nucleocápsides, el transporte, la liberación de virus no ocluidos (BV) y la degradación del genoma huésped. La producción logarítmica de los virus no ocluidos ocurre aproximadamente de 12 a 20 hpi, después de este tiempo la velocidad de producción disminuye. La formación de virus ocluidos ocurre durante la fase muy tardía, alrededor de las 20-24 hpi. En esta etapa se unen las nucleocápsides con una sección de la membrana citoplásmica que definen a los grupos de partículas virales múltiples (MNPV's) o a las partículas virales individuales (SNPV's). Las partículas virales ocluidas pueden acumularse a lo largo de 3-5 días hasta que ocurre la lisis de las células infectadas. En promedio, se

acumulan por célula, 70 cuerpos de oclusión poliédricos con un diámetro aproximado de 5 μm (O'Reilly *et al.*, 1994, Betenbaugh *et al.*, 1999).

2.2.2 Etapas en el cultivo *in vitro*

El ciclo de vida de baculovirus en cultivos *in vitro* es prácticamente igual a la de los cultivos *in vivo* excepto que se tienen algunas consideraciones distintas. Para el caso *in vitro* se requiere necesariamente de virus no ocluidos. Como en el caso de los cultivos *in vivo*, la infección en los cultivos *in vitro* es mediada por la forma no cubierta o no ocluida del virus, el cual entra por un proceso de endocitosis adsortiva (ver **Figura 2.1**). Las nucleocápsides migran del citoplasma hasta el núcleo a través de una interacción polar con los poros nucleares. De esta manera se facilita la entrada de partículas virales al nucleoplasma. Después de que ocurre la inoculación viral, el ARN viral será detectado a los 30 minutos en el núcleo y al instante iniciará el proceso de transcripción primaria. En la sección anterior se mencionaron las etapas del ciclo de infección del baculovirus en cultivos *in vitro*, las cuales son las mismas que en cultivos *in vivo*. Debido a que el gen de la poliedrina no es esencial para la infección ni para la propagación del BV, la construcción de un baculovirus recombinante se puede llevar a cabo reemplazando el gen de la poliedrina con el gen de interés. De esta forma los genes heterólogos de productos de interés comercial se expresan mediante el control del promotor de la poliedrina (Betenbaugh *et al.*, 1999). La proteína de interés será expresada, en lugar del gen de la poliedrina en la fase muy tardía de la infección con *AcMNPV*. Además, los virus no

ocuidos pueden ser colectados del medio de cultivo celular y ser usados para infectar otras células (Caron *et al.*, 1990).

2.2.3 Expresión de genes heterólogos

Dos genes que abundantemente se expresan durante la fase muy tardía son los genes de la poliedrina y de la proteína p10. El producto del gen de la poliedrina (polh) es una proteína de 29 kDa que forma la matriz cristalina de las partículas de oclusión cuya función en la naturaleza es proteger a los baculovirus de las condiciones ambientales adversas. El producto del gen p10 es una proteína de 10 kDa que forma arreglos de fibras largas en el núcleo y ocasionalmente en el citoplasma. En 1983 se confirmó que los virus que contenían deleciones en el gen de poliedrina eran estables y podían replicarse en células en cultivo. A pesar de que las células infectadas con estos virus carecen de la propiedad de formar partículas de oclusión, la producción de BV no se ve afectada. De manera similar, se ha observado que la interrupción del gen p10 resulta en la interrupción de la matriz fibrosa, sin afectar la formación del BV y por lo tanto el promotor de p10 es también comúnmente usado para expresar proteínas heterólogas.

Debido a que los promotores de la poliedrina y p10 son fuertes y de fase muy tardía, se ha reportado que hasta el 70% de la proteína total de las células de insecto puede estar constituido por proteína recombinante. Existen otros promotores del baculovirus usados para expresar proteínas heterólogas, no obstante el de la poliedrina y el de p10 son los más comunes.

2.3 Líneas de células de insecto

Las células de insecto han sido establecidas a partir de por lo menos 100 diferentes especies dentro de las siguientes órdenes de Arthropoda: Lepidóptera (polillas y mariposas), Díptera (moscas), Homóptera (pulgas y cigarras), Hymenóptera (abejas y avispas), Orthóptera (mantis, grillos, saltamontes y chapulines) y Coleóptera (escarabajos). Estas líneas han sido aisladas de los huevos o tejidos embrionarios, larvales ó adultos tales como hemocitos, ovarios, discos imaginarios, testículos, intestino medio y en la grasa corporal, usando métodos establecidos desde principios del siglo XX para generación de líneas de células animales (Goosen *et al.*, 1992a). Los procedimientos típicos para obtener células individuales involucran la lisis del tejido seguido por la suspensión en un medio enriquecido y el cultivo en matraces o frascos. Los nutrientes son reemplazados periódicamente y los cultivos son monitoreados hasta que se observa la división celular. Las células son entonces subcultivadas después de una o varias semanas para obtener una nueva línea celular. Los aislados clonales pueden ser seleccionados ya sea por su mejor crecimiento ó propiedades de expresión genética. Fue así como se generó el clon Sf-9 el cual a su vez se obtuvo de la línea celular establecida (IPLB-Sf-21) del gusano de la mariposa otoñal, *Spodoptera frugiperda*. Ambas líneas son ahora usadas ampliamente para la replicación del AcMNPV y la producción de proteínas recombinantes. (Vaughn, 1999; Palomares *et al.*, 2002a).

Las líneas celulares son usualmente cultivadas a escala laboratorio ya sea en cajas de poliestireno ó en botellas “rodantes”. Aquellas líneas celulares que no son anclaje dependientes pueden crecer en matraces agitados ó biorreactores donde las células se

encuentran en suspensión. Las células que son dependientes a la adherencia deben ser desprendidas por agitación, raspado, ó tratamiento enzimático. Después de una fase lag, las células crecen logarítmicamente con tiempos de duplicación entre 0.5 y 2 días. Las concentraciones celulares máximas están típicamente en el orden de 10^6 cel/mL pero pueden elevarse hasta más de 10^7 cel/mL en algunos casos. Las células tienen tamaños típicos entre 10 a 20 μm y las temperaturas de cultivo típicas son entre 25 y 30°C. Los bancos celulares pueden ser criopreservados en nitrógeno líquido usando medios especiales con crioprotectores tales como el dimetil sulfóxido (DMSO) (Betenbaugh *et al.*, 1999).

2.4 Baculovirus

El baculovirus es un virus caracterizado por una estructura larga, incluye un genoma de ADN de doble hebra covalentemente cerrado y circular que se localiza empacado en una cápside en forma de bastón, de ahí su nombre derivado de la raíz *baculo* (Palomares y Ramírez, 1998).

2.4.1 Clasificación y Estructura

El género baculovirus pertenece a la familia Baculoviridae e incluye los dos géneros siguientes: virus de poliedrosis nuclear ó nucleopoliedrosis (NPV) y granulovirus (GV). Adicionalmente, los virus pueden ser o no ocluidos. Las cápsides de los baculovirus miden usualmente 40-50 nm en diámetro y de 200-400 nm en longitud (Betenbaugh *et al.*, 1999). Este tamaño permite que genomas muy largos de ADN, aproximadamente 130 kb en

longitud, puedan distribuirse a todo lo largo del baculovirus. Los dos baculovirus más comúnmente estudiados como vectores de expresión son el virus de poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) y el virus de poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV).

El ADN viral se encuentra condensado en una estructura nucleoproteica dentro de la cápside. Este conjunto llamado nucleocápside se elabora en el núcleo de las células infectadas. Después de su formación, las partículas virales son liberadas al fluido extracelular con una envoltura de membrana, llamándose viriones. Los cuerpos de oclusión poliédricos de los virus de poliedrosis nuclear (NPV's) son conocidos como poliedra. En AcMNPV, la sigla M (Múltiples) se refiere a que varios virus quedan envueltos en una misma membrana y embebidos en una matriz de poliedrina. En el segundo caso, las BmNPV son SNPV, es decir sólo una partícula viral queda embebida en la matriz proteica (O'Reilly *et al.*, 1994).

2.5 Metabolismo de las células de insecto

Las células de insecto requieren de un medio de cultivo de composición compleja para que sobrevivan y crezcan en cultivo *in vitro*. Las formulaciones de los medios de cultivo para CI son derivadas de elementos identificados originalmente en la hemolinfa del insecto (Grace y Brzostowski, 1966). Entre los componentes principales de los medios de cultivos están la glucosa y glutamina, las cuales son dos de las fuentes de carbono y energía más importantes para las CI. El metabolismo de ambos sustratos en las CI se describe esquemáticamente en la **Figura 2.2**.

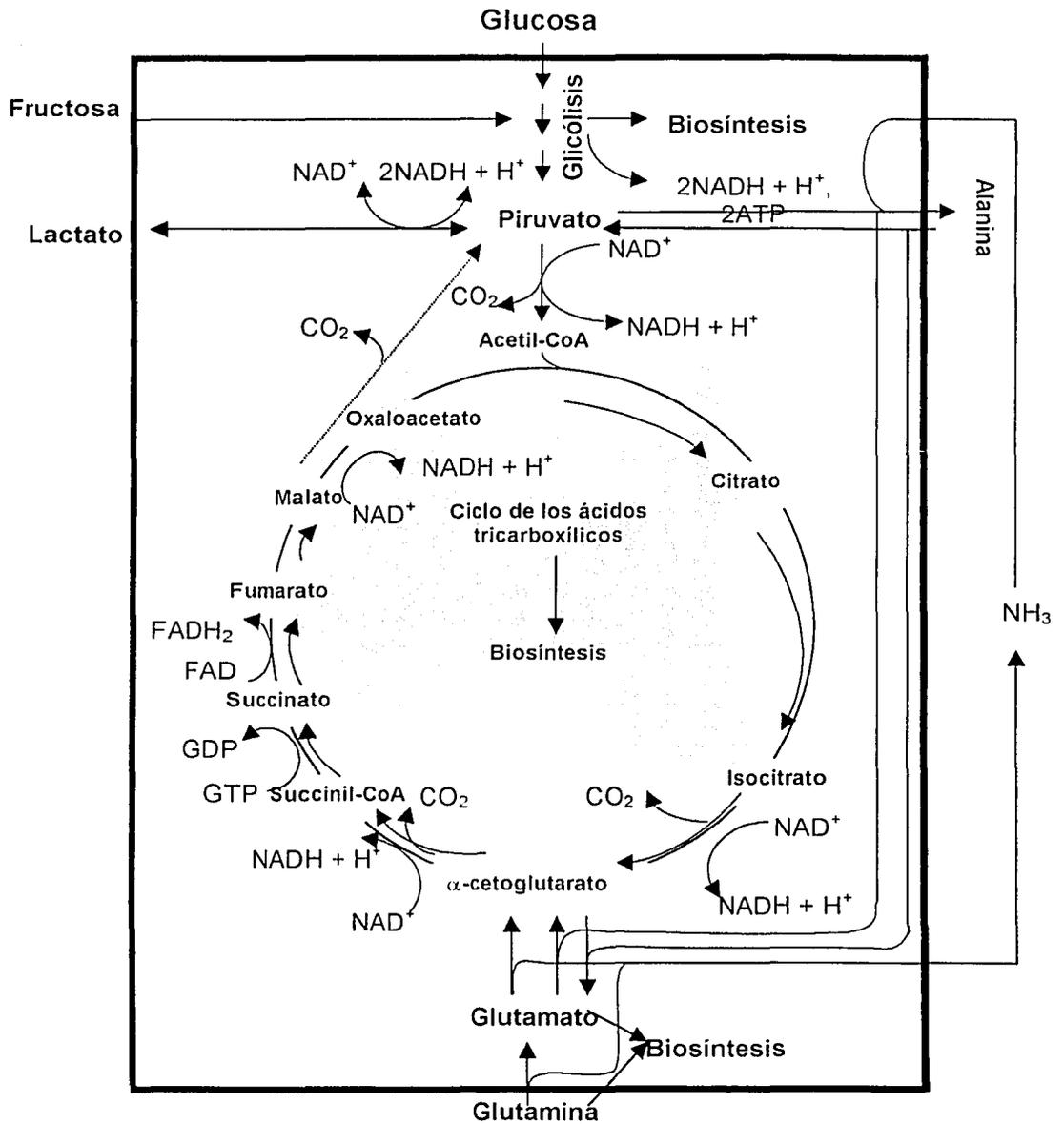


Figura 2.2 Metabolismo de glucosa y glutamina en células de insecto (Palomares, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La glucosa es el sustrato principal para el crecimiento de células de insecto (Grace y Brzostowski, 1966; Clements y Grace, 1967; Reuveny *et al.*, 1992; Bédard *et al.*, 1993). Varios autores reportan que las células preferentemente consumen maltosa y fructosa como fuente alterna de carbono cuando hay agotamiento de glucosa. En el caso de sacarosa no se ha investigado con exactitud si es utilizada o no por las células de insecto. Reuveny *et al.* (1992) no observaron aumento en la concentración celular cuando la única fuente de carbono disponible era la sacarosa. Generalmente, la sacarosa se adiciona al medio de cultivo con la finalidad de ajustar la osmolaridad (Ferrance *et al.*, 1993).

La glutamina es el otro sustrato preferente por las CI y se ha demostrado que se puede activar la vía de la glutaminólisis para generar lactato y a su vez energía (Öhman *et al.*, 1995). La glutamina es hidrolizada por la glutaminasa para originar glutamato y amonio (Mathews y Van Holde, 1999).

Además de la glutamina, hay una fracción significativa de aminoácidos como glutamato, serina, asparagina, treonina, aspartato y arginina que pueden ser consumidos durante la fase de crecimiento de las CI aunque la mayoría de las veces se puede desviar el consumo hacia la formación de energía en vez de formar biomasa.

Algunos metabolitos, incluyendo al lactato y otros ácidos orgánicos (piruvato, α -cetoglutarato, fumarato) pueden acumularse durante la fase de crecimiento y en la fase de infección. El lactato y el amonio, son los principales metabolitos de desecho resultantes del

metabolismo de glucosa y glutamina (Drews *et al.*, 1995). La producción de lactato a partir de las células Sf-9 es generalmente más baja que lo observado en células animales. El lactato no tiene efecto inhibitorio en el crecimiento, aunque se ha observado que los niveles de lactato pueden incrementar significativamente al presentarse limitaciones de OD (Wang *et al.* 1993 , Betenbaugh *et al.*, 1999). Los metabolitos secretados en el cultivo de CI pueden cambiar significativamente dependiendo de la línea celular. En particular, el amonio puede ser producido ó consumido dependiendo del tipo de línea celular y de las condiciones del medio de cultivo. Se ha reportado, que el lactato y/o amonio se generan a un nivel más alto en células de *Trichoplusia ni* y *Bombyx mori* que en células Sf-9. Además de la presencia de metabolitos tóxicos, se ha observado durante la infección viral tardía en CI que la acumulación de proteasas causa la degradación de proteína recombinante (Wang *et al.*, 1996).

Otro de los sustratos principales para el crecimiento de las células de insecto es el oxígeno. El oxígeno funciona como un aceptor terminal de electrones en la cadena de transporte electrónico (proceso de fosforilación oxidativa para producción de energía). En CI, la glicólisis aumenta a bajas concentraciones de oxígeno, observándose un incremento en la generación de lactato. A pesar de que el oxígeno es esencial para el crecimiento, es a su vez tóxico en altas concentraciones. Meneses-Acosta (2001) determinó que el daño oxidativo en cultivos de hibridomas murinos BCF2 y células de insecto Sf-9 causa degradación del ADN.

2.6 Efecto del oxígeno disuelto en cultivos de células de insecto

Varios autores han observado que una adecuada disponibilidad de oxígeno es crítica para los rendimientos óptimos del baculovirus silvestre y la producción de proteína recombinante expresadas en CI. Se ha determinado que el intervalo de velocidades de consumo de oxígeno por célula es de 3.5 a 9.9×10^{-17} mol/célula-s. La velocidad de consumo de oxígeno (VCO) de las células de insecto es ligeramente más alta que la velocidad de otras células animales. Además, la velocidad incrementa al doble alrededor de 12 a 18 hr después de la infección viral. Este periodo de VCO máximo corresponde al tiempo de la producción de viriones (Vaughn, 1999).

Las células de insecto infectadas son más frágiles que las células no infectadas (Palomares y Ramírez, 1998). Por lo tanto, incrementar la velocidad del burbujeo o la agitación resultaría contraproducente ya que se afectaría drásticamente a las células. Un tema que no se ha explorado ampliamente es la determinación de los niveles óptimos de oxígeno disuelto y el desarrollo de estrategias para mantener los mejores niveles de expresión de proteína recombinante sin afectar a las células (Bettenbaugh *et al.*, 1999).

La mayoría de los artículos del tema se enfocan principalmente a los efectos del OD sobre el crecimiento de las células Sf-9, sin embargo, existe relativamente poca información sobre los efectos en los rendimientos de proteínas recombinantes producidas en biorreactores instrumentados. De la escasa información sobresaliente, Klöppinger *et al.* (1990) observaron que la proliferación celular máxima de la línea Sf-9 fue al 40% de OD. En cultivos infectados

observaron, que manteniéndolos al 20% de OD se reducía el rendimiento de poliedra en más del 50%, comparado a cultivos a concentraciones mayores del 40% de OD.

Jain *et al.* (1991) emplearon células Sf-9 infectadas con un baculovirus recombinante para producir antistasina, un anticoagulante obtenido de glándulas salivales de sanguijuelas. En cultivos controlados a OD de 10, 65 y 110% evaluaron los efectos causados en la concentración celular y en la expresión de la proteína recombinante. Observaron, que en el nivel bajo (10%) y en el nivel alto (110%) existía un efecto negativo en el crecimiento celular y en la productividad de la proteína recombinante, a lo que concluyen que la concentración óptima de OD para ambos parámetros cinéticos fue a la concentración intermedia evaluada de 65%. Además, observaron que la muerte de células infectadas era más pronunciada al 110% de OD, atribuyéndole tal efecto a la toxicidad causada por el exceso de O₂.

Hensler y Agathos (1994) en biorreactores de 250 mL y agitados a 70 rpm controlaron el OD en niveles de 5, 10, 50 y 100%. Cada biorreactor fue inoculado con 0.4×10^6 cel/mL y las células crecieron hasta una densidad de 5×10^6 cel/mL. No observaron diferencias en concentración de células viables máximas, viabilidad y velocidades de consumo de nutrientes a los diferentes niveles de OD probados. En cultivos infectados a una concentración celular de 1×10^6 cel/mL y una MDI de 10 ufp/cel, no observaron ningún efecto del OD sobre la producción de β -galactosidasa recombinante.

Jäger y Kobold (1995) diseñaron dos sistemas sencillos consistentes en matraces agitados aereados. Un matraz fue aereado a través de una membrana de fibra hueca de propileno

conectada desde la boca del matraz por una tubería de silicón (volumen empleado de 750 ml). El segundo matraz fue aereado superficialmente. Para éste último, se emplearon dos volúmenes de medio, 300 y 750 mL. La línea celular empleada fue Sf-9 y el cultivo fue infectado a una MDI de 1 ufp/cel para expresar una variante de interleucina-2. Al comparar los diferentes sistemas de transferencia de oxígeno (volumen de 300 y 750 mL), observaron que las actividades de proteína recombinante obtenidas fueron similares. En cambio cuando se comparó el matraz aereado superficialmente de volumen menor (300 mL) con el matraz de volumen mayor (750 mL), se redujo 20 veces la actividad en el segundo debido al incremento en el volumen. Concluyeron que la limitación de oxígeno puede afectar drásticamente la producción de proteína recombinante.

Palomares y Ramírez (1996), realizaron cultivos de células Sf-9 y manipularon diferentes concentraciones de OD de 0 a 30%. Sólo observaron efectos en el metabolismo de las CI abajo del 10% de OD. Entre valores de 10 y 30% de OD no hubo efecto en la velocidad específica de crecimiento, concentración de células, consumo y producción de aminoácidos ni en la velocidades de consumo de carbohidratos. En este trabajo se determinaron los efectos del OD sobre el metabolismo de las células sin infectar. Los resultados de este trabajo se pueden tomar como base de comparación al nuestro ya que trabajaron con la misma línea celular y un sistema de control similar.

Wang *et al.* (1996), empleando la línea celular Sf-9, observaron el efecto de 3 diferentes concentraciones de OD (15, 25 y 50%) sobre dos proteínas recombinantes diferentes: una proteína extracelular (β -galactosidasa bajo el control del promotor p10) y una proteína

intracelular (epóxido hidrolasa bajo el control del promotor de la poliedrina). La actividad de la proteína intracelular fue menor en concentraciones de 15 y 50% de OD, mientras que por arriba del 25% de OD la actividad de la proteína extracelular disminuyó. Para ambas proteínas, el nivel óptimo de OD para la actividad proteica fue al 25%.

Hu y Bentley (1999) realizaron cultivos de células Sf-9 a tres condiciones de OD: 25, 50 y 80% de OD sobre células Sf-9 infectadas. Encontraron que el rendimiento de proteína fue mejor a 50% de OD, obteniendo concentraciones entre 20-30 $\mu\text{g/mL}$ de proteína recombinante. A su vez, Chico y Jägger (2000), evaluaron el impacto del oxígeno disuelto en células BTI-Tn-5C1-4 usando un biorreactor aereado a través de membrana de polipropileno y controlado a 55% de OD. Las células se infectaron con un baculovirus recombinante (que incluía el gen recombinante de una glicoproteína humana denominada traza- β) a una MDI de 5 unidades formadoras de placa (ufp)/célula y TDI de 1×10^5 cel/mL. En paralelo realizaron cultivos en suspensión (matraces agitadas) sometidos a las mismas condiciones de infección. Compararon los resultados obtenidos en ambos sistemas y observaron que el oxígeno no limitó la expresión de proteína recombinante a la densidad celular seleccionada.

Como puede observarse, la mayoría de los trabajos arriba descritos (se resumen también en la **Tabla 2.1**) sólo estudiaron tres, o menos condiciones de OD en células infectadas. Además, en muchos de estos, el intervalo estudiado fue poco relevante. En varios casos no realizaron barridos de concentraciones a valores extremos de OD. La mayoría de los datos obtenidos por algunos autores no seleccionan un valor adecuado de OD para la producción de proteína recombinante ni para el crecimiento en células infectadas. En ningún trabajo comparan la

expansión de células generadas en cultivos infectados y sin infectar bajo las mismas condiciones de cultivo. Tampoco observan los efectos de OD en las velocidades de consumo de glucosa y glutamina ni comparan los valores obtenidos en sistemas sin infectar e infectadas bajo las mismas condiciones de operación. Aún mas importante, los estudios arriba mencionados relacionan poco o nada los efectos del oxígeno disuelto con el metabolismo primario de las células de insecto infectadas. Por lo tanto, la meta de este trabajo fue abundar sobre el tema, superando las limitaciones o deficiencias de los reportes que hasta ahora se han publicado en el campo. Este trabajo reúne información que puede ser básica para conocer el metabolismo de las células de insecto y en la producción de proteínas recombinantes. Wang *et al.* (1996) sugieren la necesidad de realizar un estudio detallado del metabolismo celular en función del nivel de oxígeno, antes y después de la infección viral.

Tabla 2.1 Resumen de estudios realizados de OD en células de insecto

Autor	¿Células infectadas ó no infectadas?	Condiciones de OD evaluadas	Observaciones
Jain <i>et al.</i> (1991)	infectadas	10, 65 y 110%	A 65% OD es óptimo para crecimiento celular y productividad de antistasina.
Hensler y Agathos (1994)	ambas	5, 10, 50 y 100%	No hay efecto negativo de las condiciones de OD sobre el crecimiento celular ni en producción de β -galactosidasa.
Jäger y Kobold (1995)	infectadas	aereación sin control	Sólo observaron que a diferentes volúmenes de trabajo existe efecto en la producción de interleucina-2.
Palomares y Ramírez (1996)	No infectadas	0, 2, 5, 10 y 30%	Observaron que hay efecto negativo en el metabolismo celular por debajo del 10% OD.
Wang <i>et al.</i> (1996)	infectadas	15, 25 y 50%	Observaron que el nivel óptimo de OD para la actividad proteica de proteínas extracelular e intracelular es al 25%.
Hu y Bentley (1999)	infectadas	25, 50 y 80%	A 50% OD obtuvieron mejores rendimientos de proteína recombinante.
Chico y Jäger (2000)	infectadas	55%	Al comparar un biorreactor con un matraz agitado observaron que no hubo efecto por limitación de OD en la expresión de la proteína traza- β .

Capítulo III

Objetivos

3.1 Objetivo general

Estudiar el efecto del oxígeno disuelto sobre la producción de lactadherina humana recombinante expresada en el sistema células de insecto- baculovirus.

3.2 Objetivos específicos

- Efectuar, en biorreactores agitados e instrumentados, cultivos infectados de Sf-9 a OD constante en el intervalo de 0 a 160% para evaluar su efecto sobre:
 - producción de lactadherina humana recombinante
 - crecimiento y viabilidad celular
 - consumo de nutrientes: glucosa y glutamina
 - generación de metabolitos: lactato y glutamato

- Comparar los resultados de cultivos infectados con cultivos controles (sin infectar) de Sf-9 a OD constante.

Capítulo IV

Materiales y métodos

4.1 Línea celular

Se utilizó la línea celular SF-9 (ATCC CRL-1711). Esta línea celular proviene del ovario de la pupa del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (en México conocido como gusano cogollero del maíz y en Estados Unidos como larva de mariposa otoñal). Todos los experimentos se realizaron a partir de un mismo banco celular que inicialmente tenía la composición de medio SF900-II con suero fetal bovino (GIBCO Invitrogen Corporation, Grand Island, NY) al 40% y DMSO (Fisher Scientific International, Inc. Liberty Ln Hampton, NH) al 15%. Los bancos celulares fueron descongelados y colocados en frascos T de 25 cm². Estos cultivos estáticos se adaptaron a nuevas condiciones nutricionales con medio SF900-II (medio libre de suero) y suplementado con 0.1% v/v Pluronic F-68 (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO). Al transcurrir 3 semanas se hicieron pases de células cultivadas en frascos T a frascos con agitación controlada a 120 rpm. Todos los cultivos en frascos agitados se trabajaron con número de pase entre 35 y 50 para mantener la edad del cultivo; estos frascos sirvieron como inóculos para cada fermentación realizada en biorreactor. Cada biorreactor se inoculó con una concentración celular de 0.5×10^6 cel/mL y viabilidad superior al 90%.

4.2 Virus

Para obtener el abasto viral, se realizaron infecciones de las células de insecto en frascos agitados con una multiplicidad de infección de 0.1 ufp/célula. Esta multiplicidad es la recomendada para obtener títulos virales en el intervalo de 10^8 - 10^9 ufp/mL (Radford *et al.*, 1997b). Posteriormente y previo a los experimentos, el abasto viral fue titulado por el método de punto de dilución final ó “end-point dilution” (O’Reilly *et al.*, 1994). El procedimiento para el método de titulación se incluye en el Anexo A-1. Los cultivos se infectaron con baculovirus de *AcMNPV*. El baculovirus recombinante conteniendo el gen de lactadherina humana, la proteína modelo, fue construido por el Dr. Sandino Estrada

En el caso de los cultivos en biorreactor, se seleccionó una MDI de 1 ufp/célula. La selección de tal valor se basó en la experiencia previa del grupo y porque se ha reportado que a MDI menores de 1 ufp/célula, el rendimiento de proteína disminuye (Scott *et al.* 1992, Radford *et al.* 1997). En la sección de resultados se abunda sobre la racionalidad de la selección de una MDI de 1 ufp/célula.

4.3 Medio de cultivo

Se utilizó el medio comercial SF-900 II SFM (GIBCO Invitrogen Corporation, Gran Island, NY), el cual se compra en forma líquida y estéril lista para ser usado en cultivos de células de insecto. Este medio está basado en el medio IPL-41 (O’Reilly *et al.*, 1994) y no requiere suero fetal bovino, lo cual representa una ventaja importante en la

reproducibilidad de los datos y la facilidad para cuantificar la proteína de interés por electroforesis en gel. Este medio se complementó con 0.1% v/v Pluronic F-68, recomendado por Palomares *et al.* (2000) para evitar el daño celular debido a los esfuerzos de corte presentes en reactores agitados. El pH del medio de cultivo fue de 6.2. Ya que se trata de una formulación comercial protegida, la composición del medio no está disponible. No obstante, algunos de los componentes principales del medio han sido determinados previamente por Schlaeger (1996), Radford *et al.* (1997a), Hu y Bentley (1999), Doverskog *et al.* (2000) y se describen en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1 Componentes principales del medio SF-900 II

Componentes	Unidad	Concentración
glucosa	g/l	10
maltosa	g/l	1.2
sacarosa	g/l	2.05
glutamina	mM	10-14
aminoácidos ^a	mM	113
intermediarios del ciclo de Krebs ^b	mM	<i>c, d</i>
extracto de levadura	g/L	+
Pluronic F-68	%	+

^aconcentración total de Asp, Glu, Asn, Ser, His, Arg, Thr, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Trp, Lys, Cys y Ala. ^b2-oxoglutarato, succinato, fumarato, malato. ^cDetección por debajo del límite. ^dComunicación personal a Doverskog *et al.*, 2000. + significa que está incluido en la composición pero se desconoce la cantidad exacta.

4.4 Cultivos en suspensión

4.4.1 Cultivos en frasco agitado

Los inóculos se generaron en frascos agitados de vidrio (spinner flasks Bellco 125 mL). Se utilizó un volumen de trabajo de 50 mL. Los cultivos fueron incubados a una

temperatura de 27° C y agitados a una velocidad de 120 rpm. Estos cultivos se emplearon para preparar los inóculos para los estudios en biorreactores. De acuerdo a la cuenta viable observada por tinción con azul de tripano, se requirieron aproximadamente 80 mL de inóculo para llegar a una densidad inicial de 0.5×10^6 cel/mL en el biorreactor instrumentado (ver más adelante). Por lo tanto, el volumen del inóculo fue de 30% del volumen de trabajo.

4.4.2. Diseño del biorreactor

En la **Figura 4.1A** y **4.1B** se muestra el diseño del biorreactor, con las medidas principales, utilizado en este trabajo. El agitador magnético empleado tenía 0.5 cm de espacio entre la base de la jarra de vidrio y la base del agitador. El ensamble del biorreactor consistió de tres partes: la jarra de vidrio, una brida con tornillos y una tapa de acero inoxidable 316. La tapa de acero inoxidable junto con la brida tienen un diseño estándar para adaptarse a cualquier jarra de 1 L tipo Virtis (Gardiner, NY). La capacidad final de la jarra de vidrio fue de 300 mL. El área superficial por volumen del reactor es mayor a las geometrías estándares, esto con el fin de aumentar la velocidad de transferencia de oxígeno al medio empleando solamente aereación superficial.

En la **Figura 4.1B**, se muestra la vista inferior de la tapa. Bajo la tapa se incluye un empaque de 10 cm de diámetro interno para evitar fugas de gases al ajustar la tapa sobre la boca de la jarra. En los orificios de las tapas se colocaron conectores tipo Swagelok (Solon Road, Solon, OH) con sus respectivas tuercas, para colocar los siguientes accesorios:

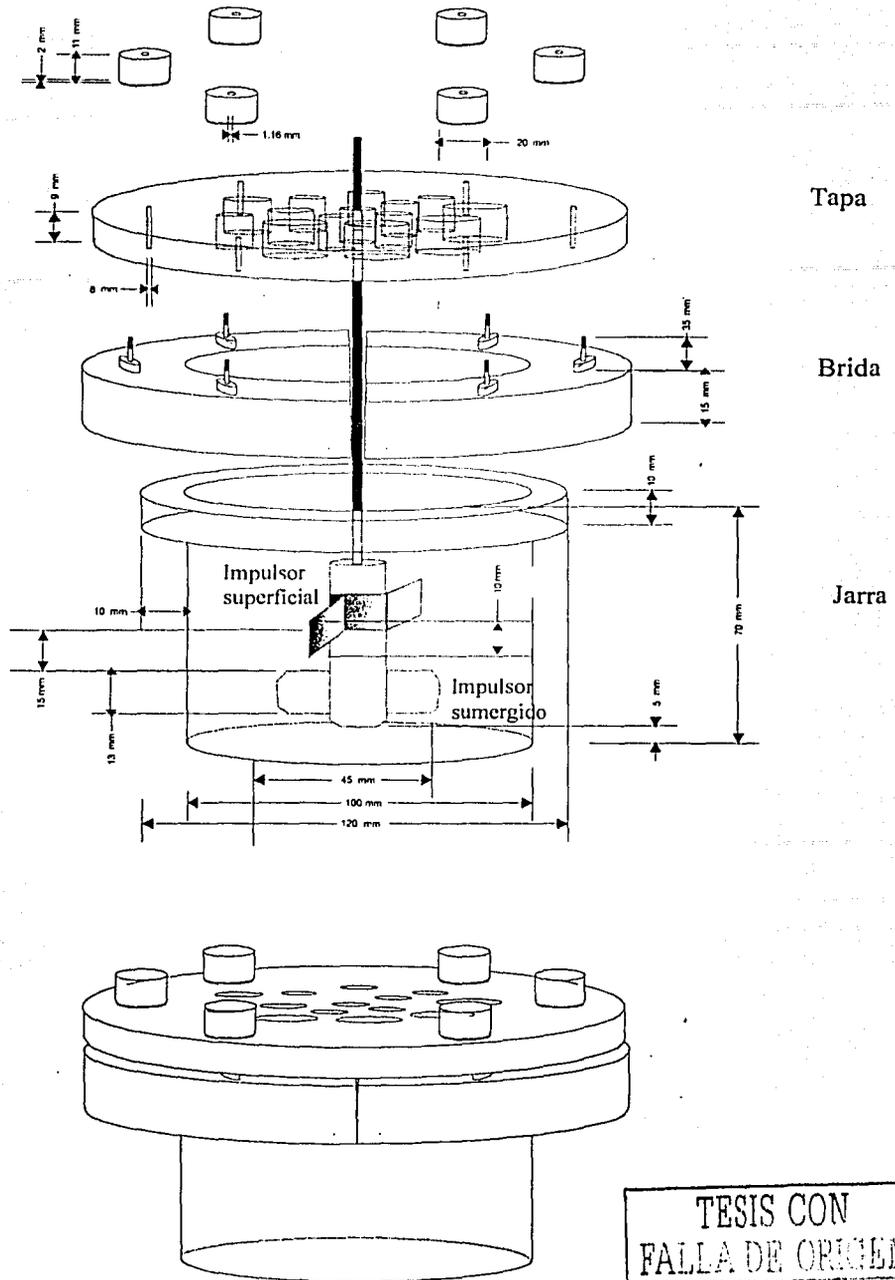


Figura 4.1A Diagrama del biorreactor, vista 3D.

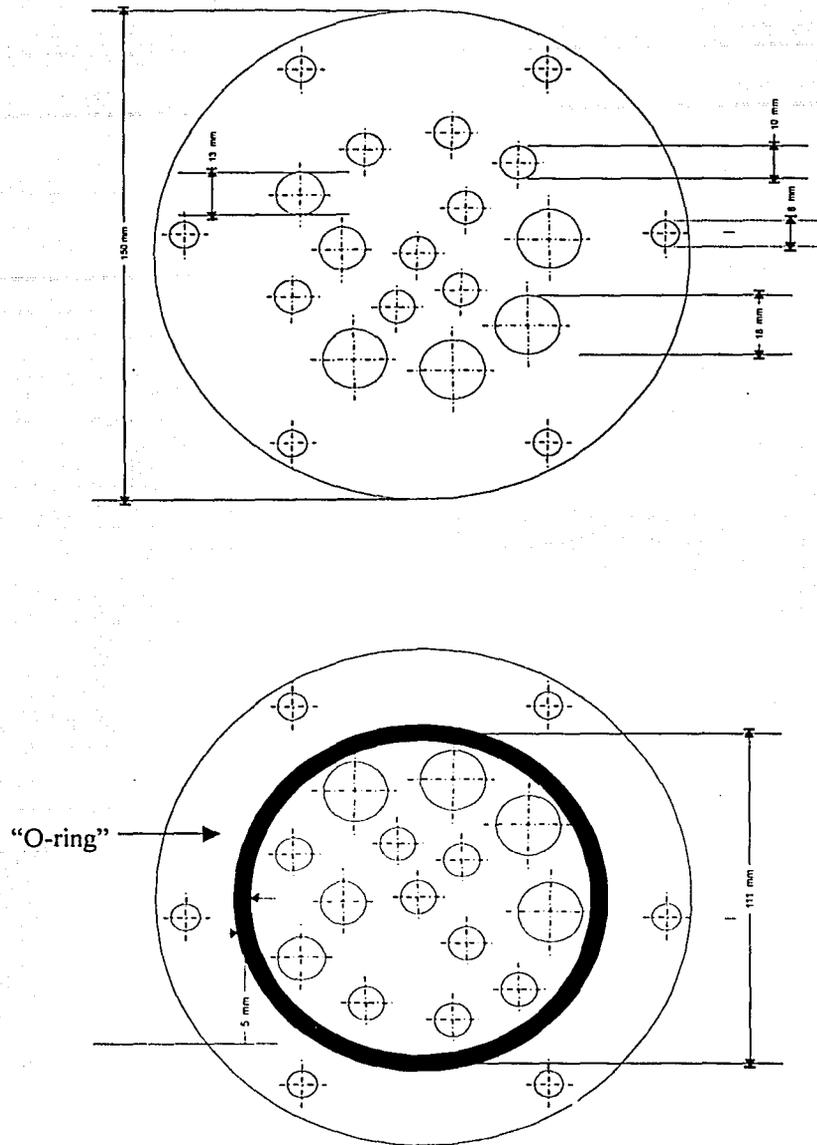


Figura 4.1B Diagrama del biorreactor, vistas superior e inferior de la tapa.

TESIS CON
FALLA DE

Puertos grandes (DI = 1.27 cm): 1 refrigerante, 1 electrodo de oxígeno disuelto, 1 electrodo de pH, 1 puerto para inóculo viral (incluye tapa ciega).

Puertos medianos (DI = 0.9525 cm): 1 resistencia, 1 adicional.

Puertos chicos (DI = 0.635 cm): 1 tubería para entrada de gases, 1 termopar, 1 toma muestra, 1 tubería entrada de aire, 1 tubería para salida del agua, 1 tubería para entrada del inóculo, 1 tubería para agitación, 1 adicional.

Una fotografía del biorreactor instrumentado completo con accesorios y electrodos se muestra en la **Figura 4.2**. Para solucionar el problema de la transferencia de masa se utilizaron dos tipos de impulsores: una barra magnética suspendida con longitud de 4.5 cm y un impulsor de dos paletas planas metálicas colocado a 1.5 cm de la barra magnética. La mitad del segundo impulsor (superficial) se encontraba sumergido en el líquido.

4.4.3 Cultivos en biorreactor instrumentado

Los cultivos se realizaron en biorreactores instrumentados descritos en la sección anterior. El volumen de trabajo fue de 250 ± 5 mL en todos los casos. El reactor fue equipado con un electrodo polarográfico (Ingold Electrodes, Inc., Wilmington, MA) para medir oxígeno disuelto y un electrodo de vidrio (Ingold Electrodes, Inc., Wilmington, MA) para medir pH. La temperatura del cultivo se mantuvo a 27°C y a una velocidad de agitación de 120 ± 2 rpm. Los controles de temperatura y de agitación se efectuaron a través de dos bases

para biorreactor marca Virtis y SEV. Todos los cultivos iniciaron con una concentración de 0.5×10^6 cel/mL y se mantuvieron a un OD constante de 20% con respecto a la saturación con aire hasta alcanzar una concentración celular de $1.5 (\pm 0.15) \times 10^6$ cel/mL.

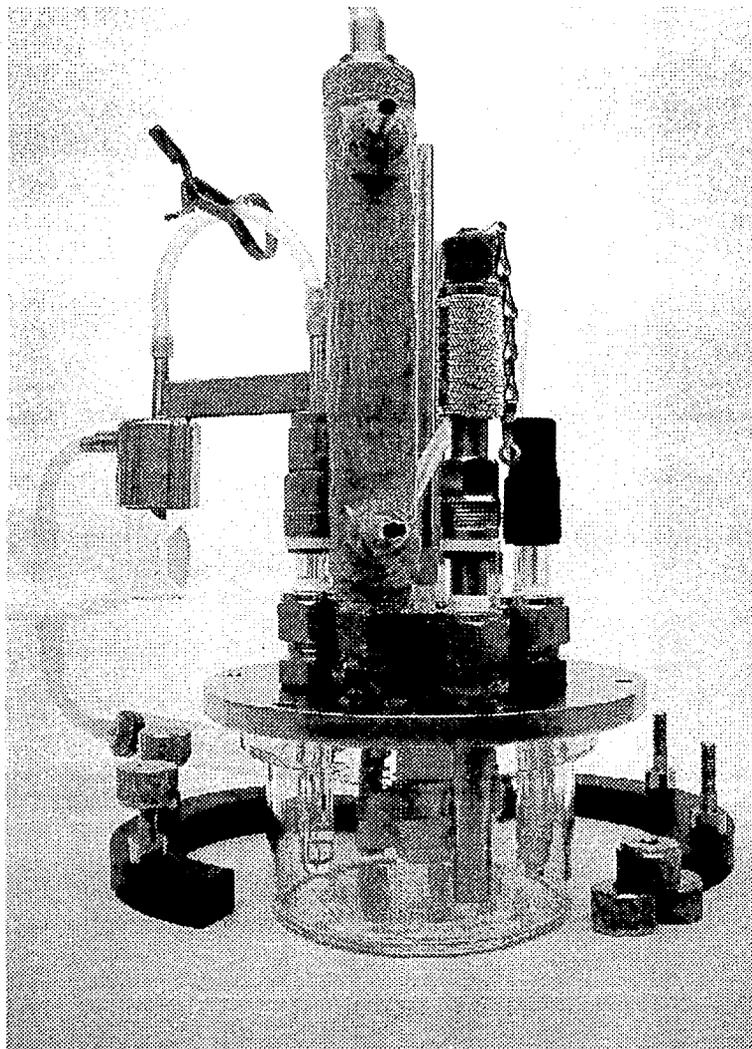


Figura 4.2 Biorreactor instrumentado de capacidad 300 mL.

Una vez alcanzada la concentración celular de 1.5×10^6 cel/mL se realizó un cambio escalonado en el OD para llevarlo al valor de prueba deseado. Después de que el OD se estabilizara en el nuevo valor, los cultivos se infectaron a una MDI de 1 ufp/célula. A partir de ese momento se siguieron las cinéticas de infección hasta que la viabilidad decayó aproximadamente a 30%. Adicionalmente se realizaron cultivos control donde se siguió la misma secuencia que en los cultivos infectados pero sin la adición de abasto viral después del cambio escalonado de oxígeno disuelto. Para los cultivos control se probaron tres valores de oxígeno disuelto: 3, 20 y 160%, mientras que para los cultivos prueba se ensayaron seis valores: 0, 3, 12, 20, 80 y 160%. Cada cultivo fue realizado por duplicado. El control de OD se realizó mediante la manipulación automática de la concentración de O_2 ó aire y N_2 en la corriente gaseosa de entrada. El flujo total de gases fue de 300 mL/min y la aereación fue superficial, es decir a través de la superficie del líquido y sin burbujeo sumergido. Tanto el N_2 como el O_2 ó el aire para los cultivos se suministraron a través de cilindros de gases presurizados. Para los cultivos a 0, 3 y 12% de OD se utilizó una mezcla aire/ N_2 mientras que para el caso de los cultivos 20, 80 y 160% se utilizó una mezcla de O_2 / N_2 . En las últimas horas de la fase de muerte la mezcla de gases se cambió a aire/ N_2 para los últimos 3 cultivos mencionados. En todos los casos el control de la composición aire/ N_2 ú O_2 / N_2 se realizó mediante un sistema similar al reportado anteriormente por Palomares (1996) y Palomares y Ramírez (1996), descrito en la siguiente sección.

4.4.4 Sistema y programa de control y adquisición de datos

El sistema de control y adquisición de datos fue diseñado anteriormente en nuestro grupo por Aguilar-Aguila *et al.* (1993). La tensión de oxígeno disuelto se controló a un

valor constante y predeterminado a través de la variación de la composición de gases a la entrada (oxígeno o aire y nitrógeno) por medio de un algoritmo de control proporcional, utilizando una ganancia entre 1 y 2.5 a lo largo de las distintas condiciones de cultivo. El flujo de gases se controló a través de dos controladores de flujo másico 5850E (Brooks Instruments, Hatfield, PA), uno para oxígeno ó aire y otro para nitrógeno (cada uno de ellos con una capacidad de 0-1000 mL/min), (ver **Figura 4.3**). Con base en la experiencia obtenida por Palomares (1996) los gases se alimentaron por aereación superficial con 300 mL/min.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinación de concentración de células totales y viabilidad celular

La concentración de células totales se determinó utilizando un contador de partículas Coulter (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL) con un tubo de apertura de 100 μ m y utilizando una solución isotónica para diluir muestras. La viabilidad se determinó con la técnica de exclusión de azul de tripano en un hematocitómetro.

4.5.2 Determinación de glucosa, glutamina, lactato y sacarosa

La concentración de glucosa, glutamina, lactato y sacarosa se determinaron enzimáticamente utilizando un analizador bioquímico YSI modelo 2700 (Yellow Springs

Instruments, Yellow Springs, OH). El analizador cuenta con membranas en las que se inmovilizan las enzimas glucosa oxidasa y L-lactato oxidasa para determinar glucosa y lactato, respectivamente.

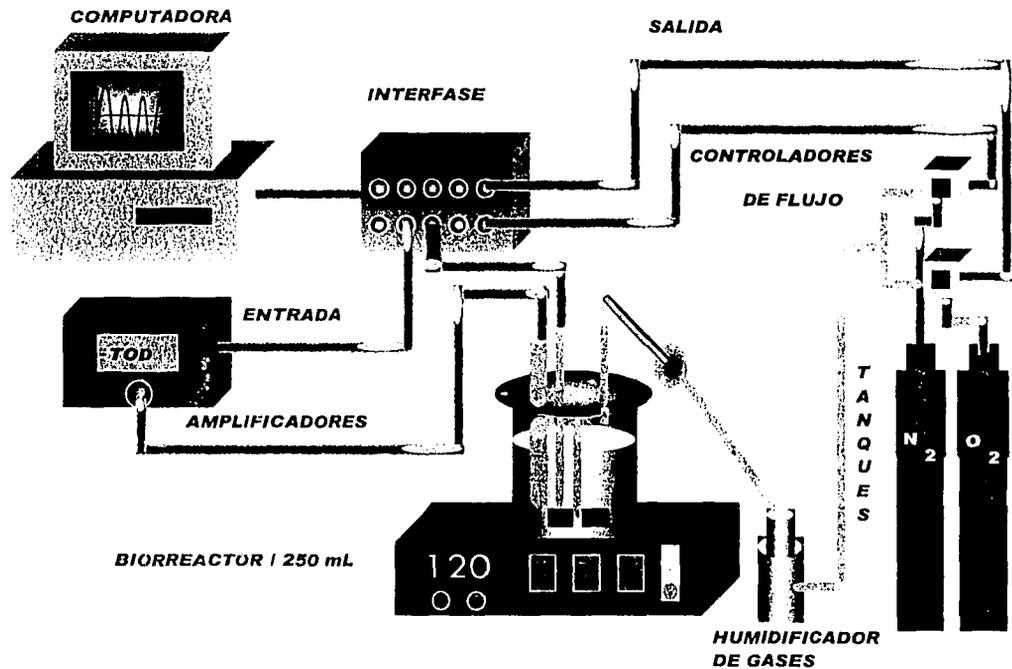
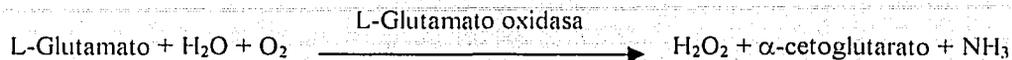


Figura 4.3 Diagrama del sistema de cultivo, control y adquisición de datos.

Para el caso de la glutamina se emplean dos enzimas (la glutaminasa y la L-glutamato oxidasa) inmovilizadas en una membrana semipermeable. Las reacciones catalizadas por estas enzimas son las siguientes:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Debido a que la primera reacción produce una mol de L-glutamato por mol de glutamina, el analizador debe estar equipado con una membrana de glutamina y una de glutamato. De tal forma, el glutamato oxidado produce, mol a mol, peróxido de hidrógeno, α -cetoglutarato y amonio (Michal G., 1999). El equipo calcula entonces la concentración de glutamina por sustracción de la concentración de glutamato global de la del glutamato inicial que no proviene de la desaminación de la glutamina.

Las enzimas para cada sustrato (excepto glutamina y sacarosa) catalizan la reacción entre la muestra y el oxígeno para formar un derivado y peróxido de hidrógeno. El analizador contiene un sistema de electrodos amperométricos que detectan la concentración del peróxido. De tal forma, el flujo de corriente en el circuito del ánodo de platino es linealmente proporcional a la concentración de glucosa, glutamina y lactato. Para determinar sacarosa primero se transforma a glucosa y fructosa por medio de la enzima β -fructosidasa (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN. No. Cat. 104914). Ver procedimiento en **Anexo A-2**. Posteriormente, se determina la concentración de glucosa final en el YSI (glucosa presente en la muestra más la glucosa formada por la inversión de

la sacarosa). Ya que la concentración de sacarosa es estequiométricamente proporcional a la concentración de la glucosa formada, se puede calcular su concentración restando la concentración de la glucosa final menos la inicial de la muestra sin hidrolizar.

4.5.3 Cuantificación de la proteína recombinante

La cuantificación de la proteína recombinante se realizó por electroforesis en gel y posterior análisis de imagen (gel escaneado) a través del software NIH image 1.61. Las muestras recolectadas de los lotes infectados y cultivos controles fueron de aproximadamente 4.5 mL y 1 mL, respectivamente. Las muestras de las cinéticas de crecimiento y de producción fueron centrifugadas a 14,000 rpm (16,000xg) por 10 min para recuperar el agregado celular (la lactadherina se produce como proteína asociada a membrana). El sobrenadante recuperado se utilizó para el análisis de los metabolitos antes mencionados y puede ser utilizado como reserva viral si se mantiene refrigerado a 4°C.

El agregado celular de las cinéticas de producción fue resuspendido en buffer de TRIS HCl 25 mM pH 7.0. La muestra solubilizada fue sonicada (Branson Sonifier Modelo 250, VWR Scientific, West Chester, PA) a 4 ciclos de 30 segundos manteniendo un suministro de energía a 25W. Se adicionó Triton X-100 (t-octilfenoxipoli-etoxietanol, Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO) al 1.25 % v/v para solubilizar la proteína recombinante y se centrifugó a 14,000 rpm (16,000xg) por 8 min para sedimentar los restos celulares. Finalmente, la proteína permaneció en el sobrenadante generado. Al realizar cada gel de poliacrilamida, se utilizó un estándar de albúmina de suero bovino (133 µg/mL) para tomar como base de cálculo en la cuantificación de la proteína de interés. Un volumen de 10

μL de muestra es requerida para realizar el análisis de la proteína por SDS-PAGE al 10%. El número total de pozos empleados en el gel dependen de las diferentes cinéticas (ver **Figura 4.4**): un canal es empleado para la albúmina usada como marcador de peso molecular de 66 kDa y otros dos más para muestras de control positivo que contienen la proteína de interés obtenida a partir de un cultivo infectado y realizado en un frasco agitado. Posteriormente, se tiñó el gel con azul de Coomassie y se dejó en agitación por 10 min. Al término del tiempo, el gel se lava con agua destilada y se destiñe con ácido acético al 10%. El procedimiento realizado para el análisis y cuantificación de proteína recombinante se explica en **Apéndice B-1**.

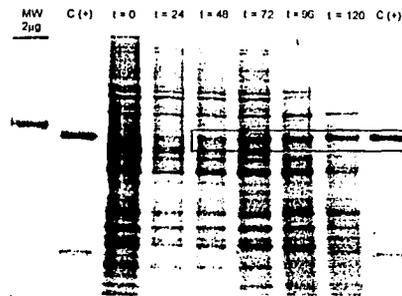


Figura 4.4. Gel típico de poliacrilamida al 10%. El primer carril corresponde a la albúmina usada como marcador de peso molecular de 66 kDa, el carril 2 y 9 corresponde al control positivo de la proteína de interés, los carriles del 3 al 8 corresponden a las muestras tomadas a diferentes tiempos de post-infección (0, 24, 48, 72, 96 y 120 hpi), respectivamente. La cinética ilustrada es de un cultivo controlado al 80% de OD.

4.6 Consideraciones matemáticas

4.6.1 Cálculo de parámetros cinéticos del cultivo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al establecer desde un principio varias condiciones ambientales en una fermentación, es muy probable que varíen durante el transcurso de la misma a no ser que sean controladas de manera externa. Tales condiciones pueden tener un efecto notable en el crecimiento celular con respecto al tiempo (dx_v/dt). Algunas de las variables más notables son temperatura, pH, concentración de sustrato, concentración de células viables, etc. En 1942, Monod estableció un modelo de crecimiento celular homólogo a la expresión descrita por Michaelis-Menten para enzimas. Considerando que durante la fase de crecimiento y la fase de muerte, la velocidad de crecimiento en cultivo de células sin infectar está descrita por la ecuación:

$$\frac{dx_v}{dt} = r_{xv} = \mu \cdot x_v \quad (4.1)$$

donde r_{xv} es la velocidad volumétrica de producción de biomasa con unidades de células $\text{mL}^{-1}\text{h}^{-1}$, x_v es la concentración de células viables con unidades de células mL^{-1} y μ es la velocidad específica aparente de crecimiento en h^{-1} . La integración de la ecuación 4.1 da una expresión para x_v en función del tiempo. Si μ es constante podemos integrar directamente con la condición inicial $x_v = x_{v0}$ a $t = 0$, resultando la siguiente ecuación:

$$x_v = x_{v0} \cdot e^{\mu t} \quad (4.2)$$

donde x_{v0} es la concentración de células viables en el tiempo cero. La ecuación 4.2 representa el crecimiento exponencial (Quintero, 1993; Doran, 1999).

Para el caso de células infectadas, el crecimiento celular se comporta de manera diferente que en células no infectadas. La velocidad específica de crecimiento se desacelera por la infección del virus recombinante y no se mantiene constante a lo largo de la fase de crecimiento. Las curvas típicas de células infectadas no muestra un perfil exponencial como el que se observa en cultivos no infectados. Este efecto observado en el sistema CI-BV anula la aplicación de la ecuación 4.2. Por lo tanto, para caracterizar las cinéticas de crecimiento de cultivos infectados se decidió definir el parámetro “expansión celular”. La expansión celular no es más que el cociente de la concentración máxima (x_{vmax}) alcanzada en cada cultivo entre la concentración inicial al tiempo de infección. En la literatura, a la concentración celular al momento de infectar se le conoce como tiempo de infección (TDI) y aunque parezca contradictorio es una costumbre plenamente establecida que el TDI se exprese en unidades de células por unidad de volumen. Por tal razón, en este trabajo se decidió seguir la convención sobre el término TDI. La expansión celular representa las veces que la población celular aumentó después de la infección y se define como:

$$E = \frac{x_{vmax}}{TDI} \quad (4.3.)$$

4.6.1.1 Cálculo de la velocidad específica de producción de proteína recombinante

Existen varios modelos propuestos para la producción de diferentes metabolitos en diversas líneas celulares tanto en procariotes como en eucariotes. Luedeking y Piret,

propusieron una ecuación que combina dos términos, producto asociado al crecimiento y no asociado al crecimiento:

$$\frac{dp}{dt} = (\alpha \cdot \mu + \beta)x_v \quad (4.4)$$

donde dp/dt es la velocidad volumétrica de producción de proteína recombinante (pr) con unidades de $\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}^{-1}$, α es una constante estequiométrica y β es una constante cinética. Para aplicar este modelo a nuestro sistema, es necesario observar con detenimiento el comportamiento de las cinéticas de producción de pr y generación de biomasa. En la **Figura 4.5**, se muestra un ejemplo de las cinéticas típicas del sistema CI-BV. Obsérvese, que en las primeras 24 horas de post-infección (hpi) sólo hay generación de células pero no hay producción del metabolito. A partir de las 48 hpi se observa que hay expresión de la proteína recombinante y es evidente que a partir de las 72 hpi hay un descenso de la producción de pr. Este efecto correlaciona con la caída drástica de la concentración de células viables.

Antes de la infección del cultivo, el perfil de concentración de células viables muestra un comportamiento exponencial pero después de la infección el crecimiento se ve arrestado causando una desaceleración de la velocidad de crecimiento. Por otro lado, la velocidad de producción de pr incrementa desde las 24 hasta las 72 hpi, esto coincide cuando las células finalizan su fase de crecimiento. El comportamiento de ambas cinéticas simulan un modelo mixto como el propuesto en la ecuación 4.4. No obstante, la μ es

comparativamente menor a los otros términos de la ecuación 4.4, por lo que es posible excluir el primer término. Por lo tanto, el modelo queda reducido a la siguiente expresión:

$$\frac{dp}{dt} = \beta \cdot x_v \quad (4.5)$$

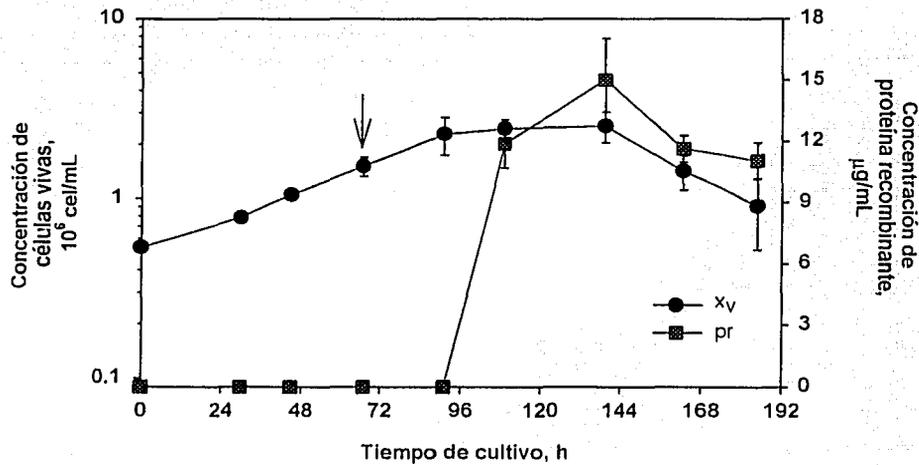


Figura 4.5 Perfil cinético del lote infectado y controlado a 160% de OD. Observe que la producción de proteína inicia a las 48 hpi y decae después de las 72 hpi. La flecha vertical indica el inicio de la infección y del cambio escalonado de 20 a 160% OD.

donde β es una constante de producción de producto no asociada al crecimiento equivalente a la velocidad específica de producción de pr (μ g / cel-h) y p se refiere a la concentración de pr . Integrando la ecuación 4.5 se obtiene la siguiente ecuación:

$$p = p_0 + \beta \cdot \int_0^t x_v \cdot dt \quad (4.6)$$

donde p_0 es la concentración de proteína al tiempo cero, que en nuestro caso es a igual a cero.

El término $\int xdt$ es conocido como el índice de viabilidad, y se determina como el área bajo la curva de concentración de células viables contra el tiempo. El índice de viabilidad puede ser calculado fácilmente por el método de los trapecios (Luan *et al.*, 1987 y Ramírez y Mutharasan, 1990, Yamaji *et al.*, 1999). El procedimiento para calcular la velocidad específica de producción de pr está incluido en el Apéndice B.

4.6.1.2 Cálculo de las velocidades específicas de consumo de sustratos durante la fase de producción

Los coeficientes metabólicos de glucosa y glutamina se determinaron con la ecuación propuesta por Yamaji *et al.*, 1999:

$$-s = -s_0 + \beta \cdot \int_0^t x_v \cdot dt \quad (4.7)$$

donde β es la velocidad específica de consumo de glutamina ó glucosa, s es la concentración de glucosa o glutamina, s_0 es la concentración inicial de glucosa ó glutamina y $\int xdt$ es el índice de viabilidad que se había calculado de la misma manera como en el

caso anterior. La ecuación 4.7 parte de la tasa de consumo específico de un sustrato en cultivos por lote;

$$\frac{ds}{dt} = q_s \cdot X_v \quad (4.8)$$

donde ds/dt es la velocidad volumétrica de consumo de un sustrato (s) y q_s es la velocidad específica del metabolismo o cociente metabólico. Ya que $q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}}$, y considerando que $Y_{x/s}$ es constante, entonces en la ecuación 4.7 q_s es igual al coeficiente β considerado por Yamaji, *et al.* (1999). El procedimiento para calcular las velocidades específicas de consumo de sustratos está incluido en el **Apéndice B**.

4.6.2 Cálculo de parámetros estequiométricos del cultivo

4.6.2.1 Cálculo de rendimientos durante la fase de producción

4.6.2.1.1 Cálculo para rendimientos de producción de proteína recombinante sobre consumo de sustratos ($Y_{p/glc}$ ó $Y_{p/gln}$)

El cálculo se hizo a partir de la división de la velocidad específica de producción de proteína recombinante (q_p) entre la velocidad específica de consumo del sustrato (q_s). Ambos datos fueron obtenidos en cada una de las cinéticas. La unidad reportada es μg pr producida/ μmol sustrato consumido, donde sustrato es glc ó gln.

$$Y_{x/s} = \frac{q_x}{q_s} \quad (4.9)$$

4.6.2.1.2 Cálculo para rendimientos de generación de biomasa sobre consumo de sustratos ($Y_{xv/glc}$ ó $Y_{xv/gln}$) durante la fase de producción

El rendimiento se calculó por la fórmula siguiente:

$$Y_{xv/s} = \frac{x_v - x_{v0}}{s_0 - s} \quad (4.10)$$

donde,

x_v = concentración máxima de células viables

x_{v0} = concentración de células viables en el momento de infección

s_0 = concentración de sustrato en el tiempo de infección

s = concentración de sustrato en el tiempo t donde se alcanza la concentración máxima de células viables

Nota: en algunos casos como los cultivos controlados a 3 y 12% OD, se eligieron máximo 3 puntos para disminuir el error en los cálculos realizados. En el Apéndice B-6 se muestra un ejemplo de cálculo de $Y_{xv/glc}$ y $Y_{xv/gln}$.

4.6.2.1.3 Cálculo para rendimiento de producción de proteína recombinante sobre generación de biomasa ($Y_{p/xv}$)

El rendimiento se calculó por la fórmula siguiente:

$$Y_{p/x_v} = \frac{p - p_0}{x_v - x_{v0}} \quad (4.11)$$

donde,

p = es la máxima concentración de proteína recombinante

p_0 = concentración de proteína recombinante en el tiempo cero

x_v = concentración máxima de células viables

x_{v0} = concentración inicial de células viables en el tiempo cero

En el **Apéndice B-7** se muestra un ejemplo de cálculo de (Y_{p/x_v})

Capítulo V

Resultados y discusión

5.1 Presentación de resultados

En el presente capítulo se describen en la primera sección los efectos del oxígeno disuelto a 3, 20 y 160% sobre el crecimiento celular en cultivos no infectados. En la segunda sección, se presentan los efectos del oxígeno sobre el crecimiento celular en cultivos infectados. En la tercera sección, se realiza un análisis comparativo de los cultivos infectados con respecto a los cultivos controles. Los párrafos resaltados con negrillas son las ideas concluyentes de cada resultado obtenido en nuestro trabajo. A partir de la información analizada, se detallan los perfiles de concentraciones máximas de biomasa y de proteína recombinante observados a diferentes niveles de OD. Las velocidades de consumo o generación de metabolitos, al igual que los rendimientos nos proporcionan información valiosa sobre el metabolismo de las células de insecto infectadas y no infectadas. La información de los efectos del oxígeno disuelto sobre los metabolitos aquí determinados en cultivos de células infectadas es muy escasa, por lo que la información generada en el presente estudio deberá ser de gran utilidad.

5.2 Cultivos control

Las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 corresponden a cada una de las 3 condiciones de OD: 3, 20 y 160%, tales variables fueron manipuladas mediante el sistema de control anteriormente mencionado.

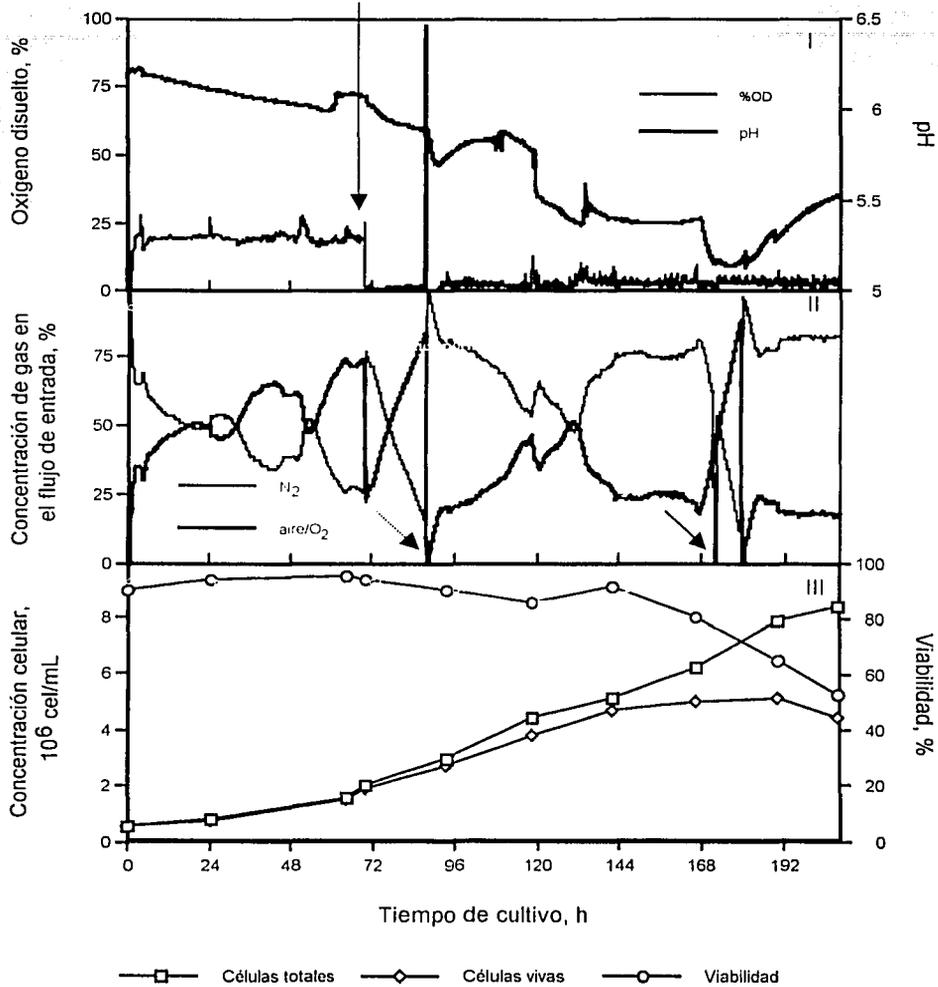
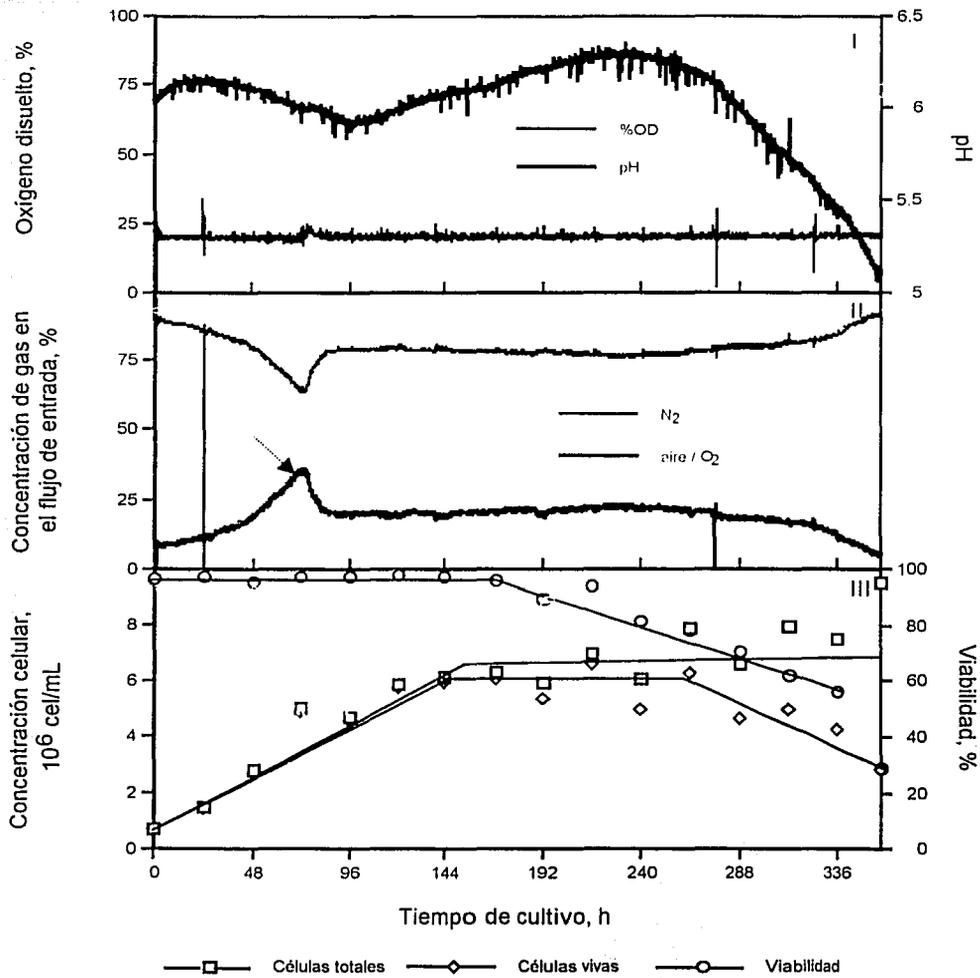


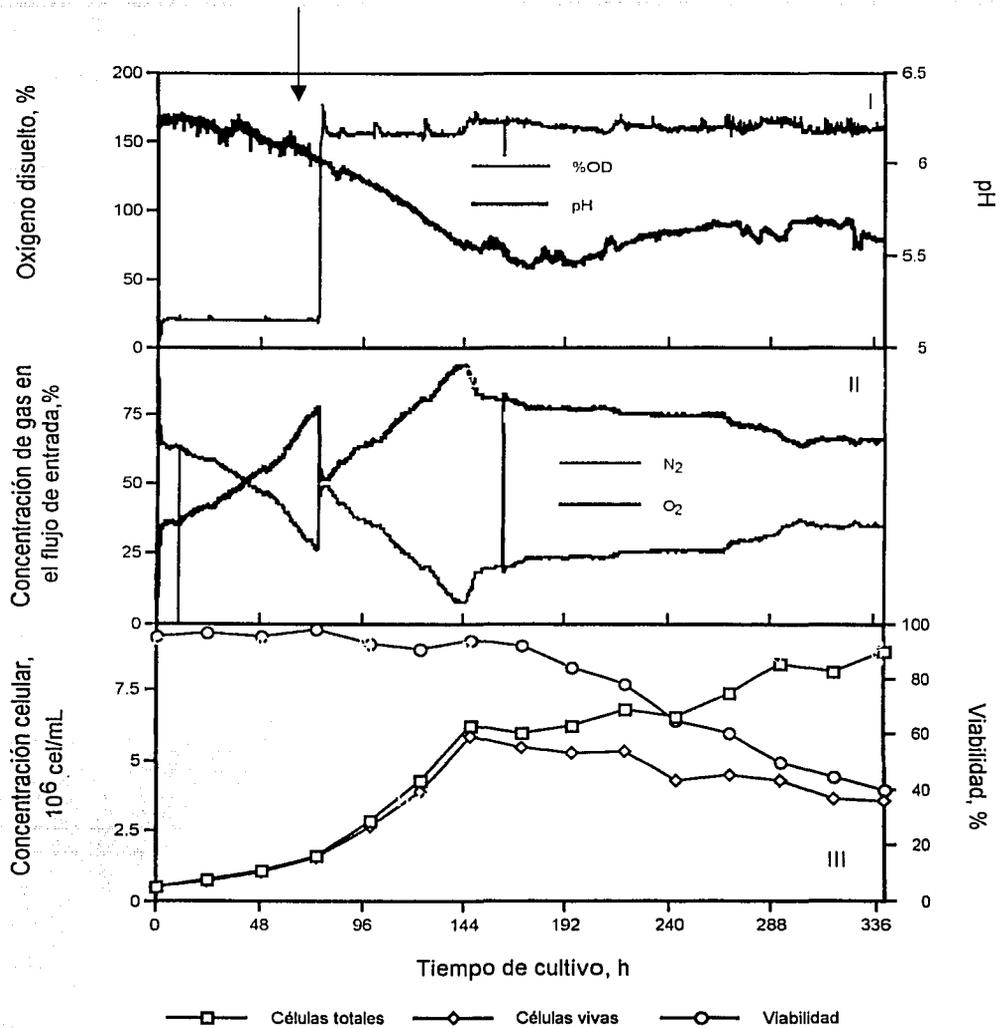
Figura 5.1 Perfiles cinéticos del cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 3% de OD. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha inclinada punteada a las 88 h indica el cambio de gas aire a O₂, mientras que la no punteada a las 172 h indica el cambio de O₂ a aire. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5.2 Perfiles cinéticos del cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 20% de OD. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha punteada a las 74 h indica el cambio de gas de entrada de aire a O₂. Al panel III se dibujaron líneas para indicar la tendencia esperada del cultivo.



TESIS CON
FALLA DE OXIGEN

Figura 5.3 Perfiles cinéticos del cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 160% de OD. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

anteriormente mencionado. Todos los lotes se realizaron por duplicado. Los duplicados de cada uno de los lotes se anexan en el **Apéndice C**.

Para evitar problemas que se pueden originar por un diseño inadecuado de los biorreactores instrumentados nos basamos en la experiencia obtenida por Palomares (1996) en fermentaciones de células de insecto. Palomares observó una disminución de la viabilidad del 82 al 30% debido al estrés generado por la aereación sumergida. Para evitar este problema y mejorar la concentración de células viables se eligió en nuestro caso utilizar solamente aereación superficial. El empleo del sistema de control y adquisición de datos permitió manipular y controlar de manera rigurosa las distintas variables ambientales, como OD, pH, agitación y temperatura. Otra de las limitantes para el crecimiento celular fue la concentración adecuada del inóculo inicial. En los experimentos realizados en el mismo trabajo de Palomares (1996), la concentración inicial fue aproximadamente 0.2×10^6 cel/mL. Todos sus cultivos, excepto los cultivos controlados a 0 y 2% de OD tuvieron una fase lag de 48 h, después de este tiempo inició la fase exponencial, en la cual se obtuvo una velocidad específica de crecimiento máxima de 0.024 h^{-1} . Palomares (1996) al final de la fase exponencial de sus cultivos alcanzaron una concentración de células viables máxima de $2.062 (\pm 0.15) \times 10^6$ cel/mL. Esta cantidad de células generadas no iba a ser suficiente para iniciar nuestros cultivos infectados a una TDI de 1.5×10^6 cel/mL. Para evitar el problema se decidió iniciar con una densidad de 0.5×10^6 cel/mL. En las **Figuras 5.1 a la 5.3 (Panel III)** se observa que las concentraciones celulares viables máximas alcanzadas en los cultivos estuvieron por arriba de lo alcanzado por Palomares (1996). En otro trabajo más reciente de Palomares *et al.* (En prensa, 2002b) usando otra línea celular, DpN1 derivada de

Danaus plexippus la concentración del inóculo resultó ser crítica. Observó que a una concentración inicial de 0.2×10^6 cel/mL no hubo aumento en la concentración celular. Tal efecto se evitó aumentando la concentración del inóculo a 0.5×10^6 cel/mL.

En la **Figura 5.1**, se observa el comportamiento del cultivo controlado a 3% de OD. El cambio escalonado de la composición de los gases se realizó aproximadamente a las 70 horas de cultivo, tal y como se indica con la flecha vertical (**panel I**). Se realizaron dos cambios en el gas de entrada. A las 88 h de cultivo (flecha horizontal punteada) se cambió el aire por O_2 en el gas de entrada. Este cambio se hizo debido a que la cantidad de oxígeno suministrada a través del aire no iba a ser suficiente para el mantenimiento del cultivo. En el **panel II** se observa que la válvula de oxígeno abrió hasta un 75% en la composición del flujo de entrada; en esa etapa el cultivo apenas se encontraba en la fase exponencial media (**panel III**). A las 172 h (flecha horizontal continua) se cambió al gas de entrada para regresar a la situación inicial con suministro de aire en vez de O_2 . Este cambio se hizo debido a que el control de OD se dificulta con O_2 cuando el consumo de oxígeno decae durante la fase de muerte. En el **panel I**, se observa que con dicha estrategia se controló adecuadamente el OD a 3%. El cultivo se continuó hasta que la viabilidad cayó a 45% (**panel III**). El pH inició con un valor de 6.2 y dado que no se controló fue disminuyendo paulatinamente hasta llegar a un valor de 5.2. El valor de pH más bajo coincidió con el término de la fase de crecimiento exponencial del cultivo. Posteriormente, cuando inició la fase estacionaria, el pH incrementó hasta llegar a un valor de 5.5 al final del cultivo. El perfil del pH siguió el mismo comportamiento que los cultivos realizados por Palomares y Ramírez (1998). Existe una correlación entre la caída del pH con la formación de lactato, tal como lo describen Tatischev y Shuler (1997). Estos autores afirman que a altas

concentraciones celulares hay formación de lactato debido a limitaciones de oxígeno. Observaron una caída de pH de 6.3 a 5.9, lo cual se asemeja al comportamiento del cultivo de la **Figura 5.1**. El pH considerado como óptimo para lepidópteros es 6.3, aunque valores menores no afectan drásticamente al crecimiento celular (González, 2000). De ahí que no fuera crítico el control de pH. En cambio, Zhang *et al.* (1994) determinaron que a valores de pH por arriba de 6.3 sí se afecta el crecimiento celular, disminuyendo 45% la velocidad específica de crecimiento máxima con respecto al valor calculado a pH óptimo.

En la **Figura 5.2**, se observa el comportamiento del cultivo controlado a 20% de OD. El tiempo de duración del cultivo fue de aproximadamente de 360 horas. A las 74 h de cultivo (flecha horizontal punteada) se cambió el aire por O₂ en el gas de entrada para evitar el mismo problema ocurrido en el cultivo a 3% de OD (**panel I y II**). Al igual que en el caso anterior, el pH inició con 6.2 y disminuyó paulatinamente durante la fase exponencial del cultivo hasta un valor de 5.8 (**panel I**). Sin embargo, a diferencia del caso anterior el pH empieza a incrementar ligeramente al iniciar la fase estacionaria hasta llegar un valor de 6.3. Cuando inició la fase de muerte del cultivo el pH disminuye nuevamente hasta llegar a un valor de 5.1.

En la **Figura 5.3**, se observa el comportamiento del cultivo controlado a 160% de OD. El cambio escalonado de la composición de los gases se realizó aproximadamente a las 75 h de cultivo, tal y como se indica en la flecha vertical (**panel I**). El tiempo de duración del cultivo fue aproximadamente de 340 h. El perfil del pH fue casi similar al lote controlado a 3% de OD (**panel I**), disminuyendo inicialmente hasta un valor alrededor de 5.5 y después aumentando hasta 5.75 durante la fase de muerte. Actualmente no hay

reportes donde correlacionen el efecto del lactato generado sobre el pH en cultivos de células controlados a condiciones oxidantes. Además, es claro que para los tres cultivos, la caída inicial del pH refleja la etapa de crecimiento exponencial; aunque no existen reportes donde correlacionen tal caída con la acumulación de un metabolito en particular. En este trabajo se incluye el perfil de concentración de lactato de los cultivos sin infectar para confirmar si el lactato puede ser el metabolito causante de la disminución del pH desde el inicio hasta al final del cultivo. Como puede verse en la Figura 5.4 efectivamente la diferencia de pH (valor de pH al momento del cambio escalonado – valor de pH al final del cultivo) es proporcional al lactato producido.

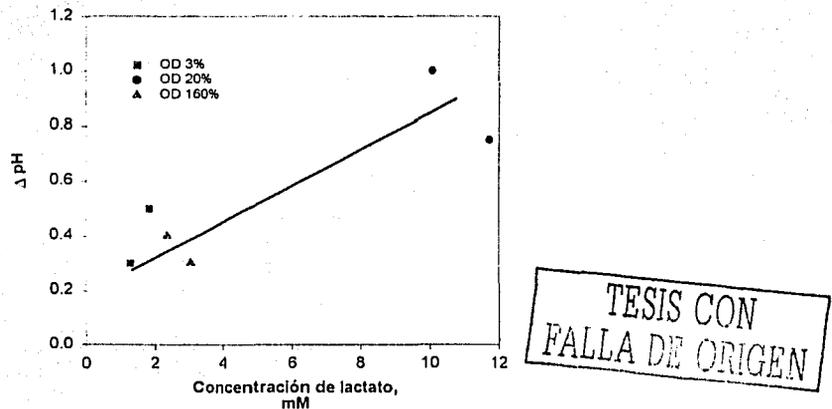


Figura 5.4 Efecto de diferentes concentraciones de lactato en el pH final de cultivos no infectados y controlados. Línea continua dibujada para indicar tendencia.

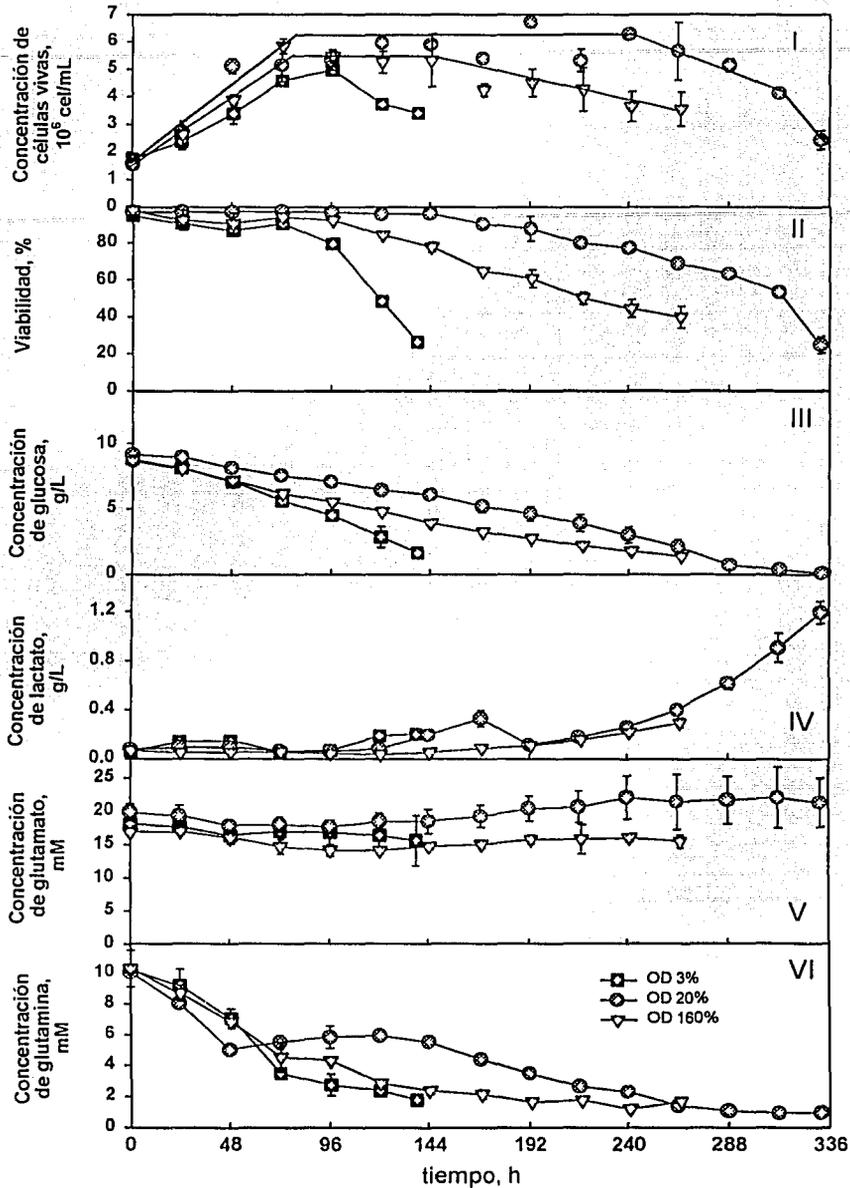
En el duplicado correspondiente al lote controlado a 3% de OD (Figura C-1) no se muestran los datos de pH (panel I) después de las 168 h. Esto se debió a perturbaciones en el sistema, pero observando el perfil de los gases y concentraciones celulares son casi

similares, **panel II** y **III**, respectivamente. En el duplicado correspondiente al lote controlado a 20% de OD (**Figura C-2**) hay un desplazamiento en la fase lag, aunque se puede observar en el **panel III**, que tal retraso no afectó a la concentración máxima de células viables. El resultado fue muy similar para ambos lotes. El mismo desplazamiento se observa para el perfil de pH. Para el duplicado correspondiente al cultivo controlado a 160% de OD no ocurren tales desviaciones (**Figura C-3**).

5.2.1 Efecto del oxígeno disuelto en el crecimiento celular

En la **Figura 5.5** se resumen las cinéticas de los 6 lotes control, mostrándose los datos promedio para cada condición de OD. En este caso solamente se incluyen los datos después del cambio escalonado de OD. En el **panel I** y **panel II** se muestran el perfil de concentración de células viables y viabilidad, respectivamente. Los gráficos de los lotes individuales se anexan en el **Apéndice C**. Los datos obtenidos antes de la concentración celular de 1.5×10^6 cel/mL (recuérdese que éste valor es el TDI usado en lotes infectados) no muestran diferencias relevantes debido a que todos los lotes fueron controlados inicialmente a 20% de OD. Estos datos (velocidades específicas de crecimiento) previos al cambio escalonado de OD están incluidos en el **Apéndice D**.

Las velocidades específicas de crecimiento (μ) calculadas para los lotes controlados a 3, 20 y 160% de OD fueron $0.0138 (\pm 0.0003) \text{ h}^{-1}$, $0.0263 (\pm 0.002) \text{ h}^{-1}$ y $0.019 (\pm 0.005) \text{ h}^{-1}$, respectivamente. El valor de μ alcanzado para el lote al 20% de OD es similar a lo



TESIS CON
FALLA DE COPIEN

Figura 5.5 Cinéticas típicas de las células Sf-9 en lotes no infectados (control) realizados en biorreactores. Sólo se muestran los datos después del cambio escalonado de OD. I. Concentración de células viables, II. % viabilidad, III. Concentración de glucosa, IV. Concentración de lactato, V. Concentración de glutamato, VI. Concentración de glutamina. Las barras de error representan el rango obtenido a partir de 2 experimentos.

obtenido por Palomares (1996) en cultivos controlados al 30%, quien reporta una μ de 0.024 h^{-1} . Esto indica que la DO crítica se encuentra por debajo de 20%. Palomares (1996) obtuvo una concentración celular máxima de $2.062 \times 10^6 \text{ cel/mL}$, sin embargo su concentración inicial fue de $0.2 \times 10^6 \text{ cel/mL}$. En este estudio, la concentración inicial que se obtuvo fue de $0.5 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ y la máxima de $6.96 \times 10^6 \text{ cel/mL}$. Adicionalmente, el medio de cultivo usado por Palomares (1996) fue el TNM-FH, cuya composición incluye 0.7 g/L de glucosa y que se sabe soporta una concentración celular menor que el SF900-II, medio utilizado en este trabajo. **La diferencia en la cantidad de glucosa entre ambos medios (ver Tabla 4.1) seguramente es responsable en buena medida de las diferencias experimentales observadas entre este trabajo y el de Palomares (1996), ya que se ha comprobado que el sustrato preferente para la generación de biomasa es glucosa (Reuveny, et al., 1992).**

La fase estacionaria del cultivo a 20% de OD duró aproximadamente 200 h, mientras que la del 160% de OD solamente duró 72 horas. En contraste, el cultivo controlado a 3% de OD no presentó fase estacionaria ya que su fase de muerte inició a las 96 horas, inmediatamente después de haber alcanzado la máxima concentración celular. En la **Figura 5.5- II** se observa la caída drástica de la viabilidad a partir de las 72 h para el cultivo a 3% OD, mientras que en los otros cultivos, la caída de la viabilidad es más lenta. Tal efecto se refleja en la concentración de células vivas de los 3 cultivos (**Figura 5.5-I**). La fase de muerte en los cultivos controlados a 20 y 160% de OD inicia a partir de las 240 y 144 h, respectivamente. **Se observó que a cultivos controlados en condiciones oxidantes (160%OD) no hay un efecto negativo importante del OD en la**

concentración máxima de células vivas. Solamente se observó un incremento de 20% en la concentración de células vivas a 20% OD comparado a lo obtenido en el cultivo a 160% de OD. Esto contrasta con lo observado por Jain *et al.* (1991) en cultivos de células Sf-9, quienes reportan que hay un efecto tóxico por exceso de O₂. En su caso observan que la máxima concentración de células decae 45% de 4.3×10^6 a 2.5×10^6 cel/mL al aumentar el OD de 65 a 110%. Es necesario mencionar que en el caso de Jain *et al.* (1991) se trató de cultivos infectados.

Como se observa en la **Figura 5.5-III**, los 3 cultivos inician con una concentración de glucosa de 10 g/L. De las tres cinéticas, la velocidad volumétrica de consumo de glucosa fue más rápida a bajas concentraciones de OD (más adelante se reportan los valores de consumo específico) aunque las células no lograron consumir totalmente tal substrato ya que se dio por terminado el cultivo antes de que eso sucediera. Para los cultivos al 20 y 160% de OD sólo quedó un remanente de 0.125 y 1.5 g/L de glucosa, respectivamente al final del cultivo. Varios autores, entre ellos, Bédard *et al.* (1993) y Palomares y Ramírez (1996) indican que los monosacáridos, tales como la glucosa y fructosa, son importantes como fuente de energía para las células de insecto y su agotamiento resulta en un cese en el crecimiento. La importancia de la glucosa para la formación de biomasa se observará más adelante en los gráficos de rendimientos.

En la **Figura 5.5-IV**, se muestra el comportamiento del lactato durante cada una de las cinéticas a los distintos valores controlados de OD. De acuerdo a lo publicado por Palomares (1996), se sabe que a bajas concentraciones de oxígeno la concentración de lactato incrementa a diferencia de los cultivos bien aerados. Se puede observar que en el

cultivo al 3% de OD, la concentración de lactato es ligeramente mayor (0.145 g/L) que los otros cultivos (0.053-0.096 g/L) durante las primeras 48 horas (fase de cultivo exponencial) aun a pesar que la concentración celular fue menor. Después de las 48 horas hubo un ligero descenso de la concentración de lactato, para mantenerse relativamente constante hasta las 96 h. Después de tal tiempo, la concentración de lactato comenzó a elevarse. La concentración máxima de lactato se alcanzó en los cultivos controlados al 20% de OD y fue alrededor de 1.15 g/L. El incremento en la concentración ocurrió durante las fases estacionaria y de muerte. Este comportamiento fue similar a lo observado por Wang *et al.* (1996) en cultivos de células Sf-9 controlados a 15, 25 y 50% de OD. En los cultivos controlados a la condición oxidante, la concentración final de lactato fue de alrededor de 0.25 (± 0.05) g/L. Palomares (1996) observó, que en cultivos controlados por arriba de 0% OD, hubo consumo de lactato, y por consiguiente una disminución en su concentración, durante la fase estacionaria y de muerte. Tal disminución en la concentración de lactato correlacionó con el agotamiento de la glucosa. **En contraste, para nuestro caso, no existió consumo de lactato ya que el agotamiento de la glucosa se dio hasta la cosecha de cada cultivo debido a la mayor concentración inicial del carbohidrato.**

En la **Figura 5.5-V**, se muestra el perfil de concentraciones de glutamato, que se obtienen, como parte de la metodología para medir glutamina, el aminoácido de interés. Se puede observar que la concentración se mantiene relativamente constante en 17.5 (± 2.5) mM. Palomares (1996) observó que por debajo del 2% OD y en condiciones de anoxia hay incremento en la concentración de glutamato durante la fase de muerte. Bédard *et al.* (1993) observaron en cultivos suspendidos que el glutamato es un sustrato utilizado más preferentemente que glutamina. En su caso, el consumo de glutamato inicia cuando se

agota la glucosa del medio TNM-FH. Esto contrasta con lo observado por Öhman, *et al.* (1995) quienes sostienen que en células de insecto, el glutamato es un metabolito que se genera a partir de la glutaminólisis (degradación de glutamina) ó por α -cetoglutarato generado a partir del ciclo de Krebs. **Tales observaciones reportadas no se asemejan a lo observado en los cultivos controles desarrollados en este estudio, posiblemente porque a diferencia de lo aquí reportado, ellos emplearon diferentes medios que incluyen en su composición bajas concentraciones de glutamina, aminoácido esencial para células de insecto. El medio SF900-II usado en nuestro trabajo está enriquecido con cantidades de glutamina suficientes para generar biomasa lo cual evita que glutamato sea consumido.**

En la **Figura 5.5-VI**, se muestra el perfil de concentraciones de glutamina. En todos los casos la concentración inicial fue de 10 mM y para las tres condiciones controladas de OD disminuyó a lo largo del cultivo hasta quedar un remanente entre 1.5 y 2 mM. El perfil de concentración a 20% de OD después de las 48 h fue relativamente constante y el consumo se volvió a restablecer a las 144 h. Al iniciar la fase de muerte, la pendiente de los perfiles cambió en todas las cinéticas, manteniéndose una concentración de glutamina constante hasta el final del cultivo. Radford, *et al.* (1997a) observaron en cultivos de Sf-9 controlados a 50% de OD que la concentración de glutamina disminuyó hasta llegar a una concentración remanente de 0.5 mM; **la disminución de la concentración no continúa durante la fase de muerte posiblemente porque glutamina fue preferentemente utilizada para formación de biomasa en las anteriores fases del cultivo. Durante la fase de muerte no se consume glutamina para el mantenimiento**

energético de las células lo que nos llevaría suponer que la glucosa es el sustrato preferente para obtención de energía en esta fase. Obsérvese en la Figura 5.5-III que la disminución de la concentración de glucosa cesa hasta el final del cultivo. Sin embargo, algunos autores afirman que la glutamina puede llegar a ser importante para mantenimiento energético (Öhman *et al.* 1995, Palomares y Ramírez, 1996). En los Apéndices C-4 y C-5 se muestran los lotes individuales de todos los cultivos controles.

5.3 Cultivos infectados

Para el caso de los cultivos infectados, se planteó el mismo diseño experimental de los cultivos control. El barrido de concentraciones de OD para los lotes infectados fue de 0, 3, 12, 20, 80 y 160 % de OD. Con tales concentraciones fue posible generar información completa e interesante acerca del efecto del OD en la producción de proteína recombinante y en el metabolismo de células infectadas. Los perfiles mostrados en las Figuras 5.6 hasta la 5.11 corresponden a cada uno de las 6 condiciones antes mencionadas. Todos los lotes se realizaron por duplicado. Las réplicas de los cultivos mostrados en esta sección (Figura 5.6-5.11) presentaron perfiles similares y se encuentran anexos en el Apéndice E.

Para la selección de la MDI adecuada nos basamos en la experiencia obtenida por Scott *et al.*, 1992; Radford *et al.*, 1997b; Vallazza y Petri, 1999; Chico y Jäger, 2000. Tales autores suponen que la disminución del rendimiento a valores bajos de MDI (<1) se debe a que la cantidad viral es tan pequeña que no logra infectar totalmente la población de CI. Un porcentaje de las células que no han sido infectadas seguirá duplicándose y agotará los

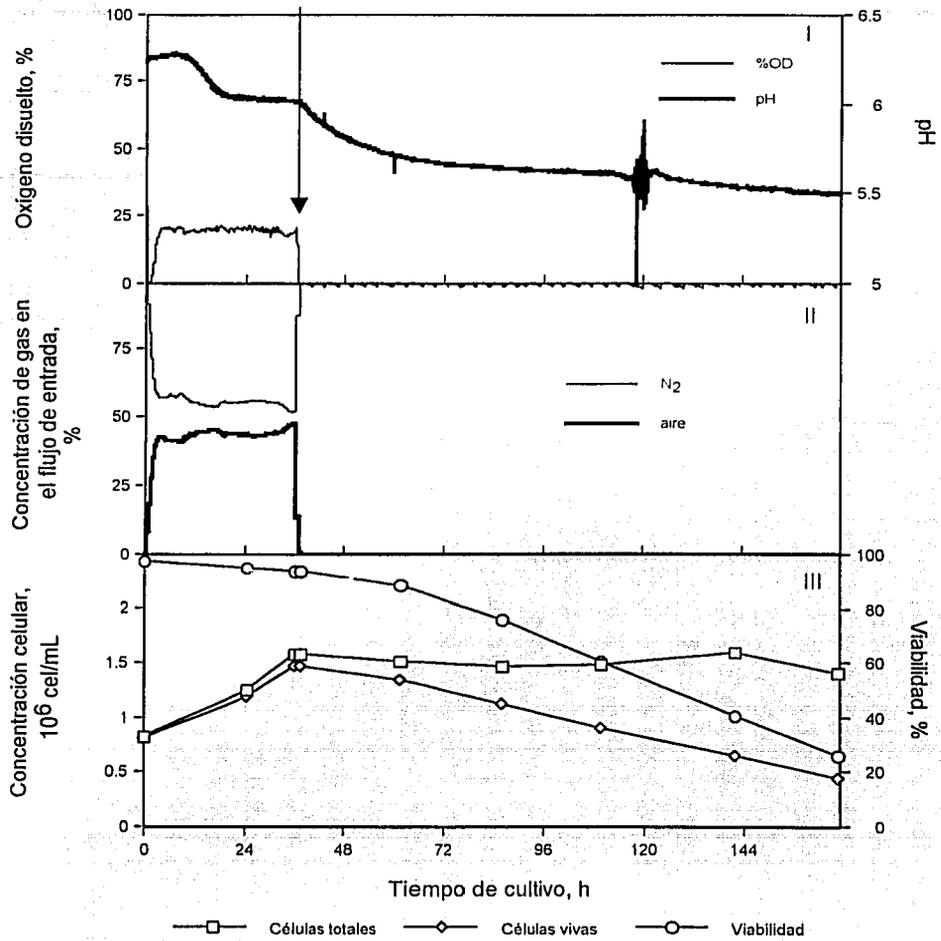


Figura 5.6 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 0%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

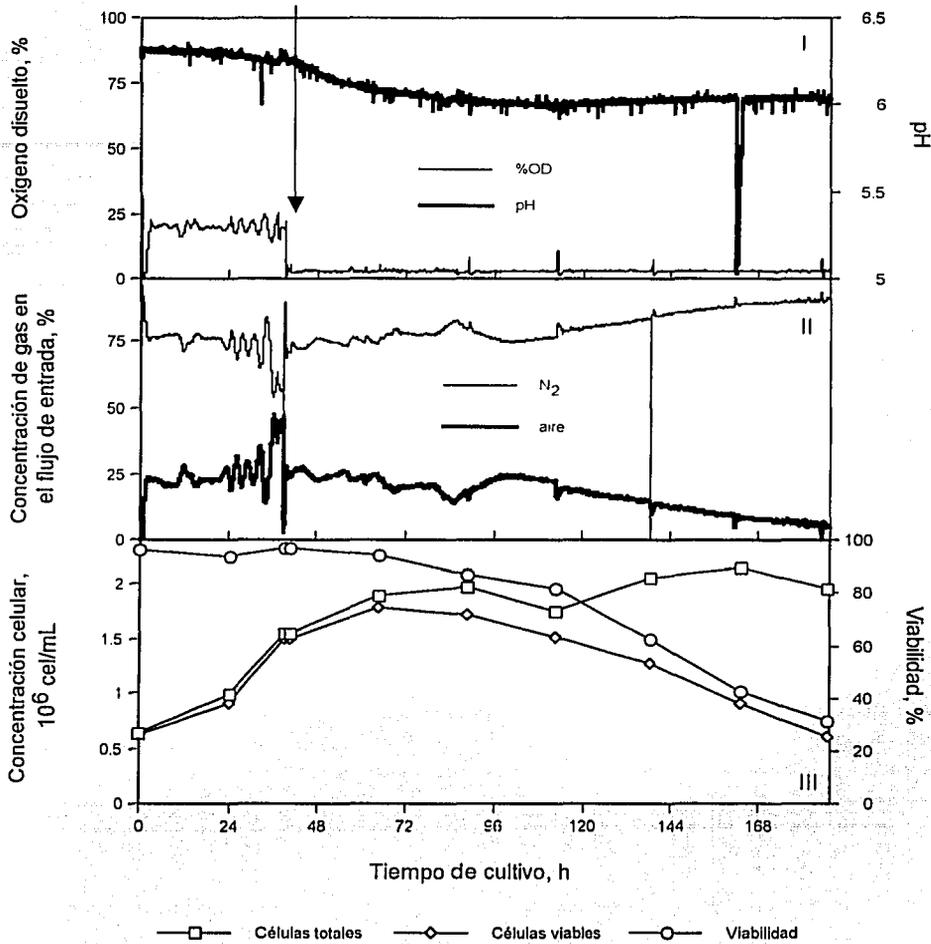


Figura 5.7 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas en biorreactor y con control de OD a 3%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

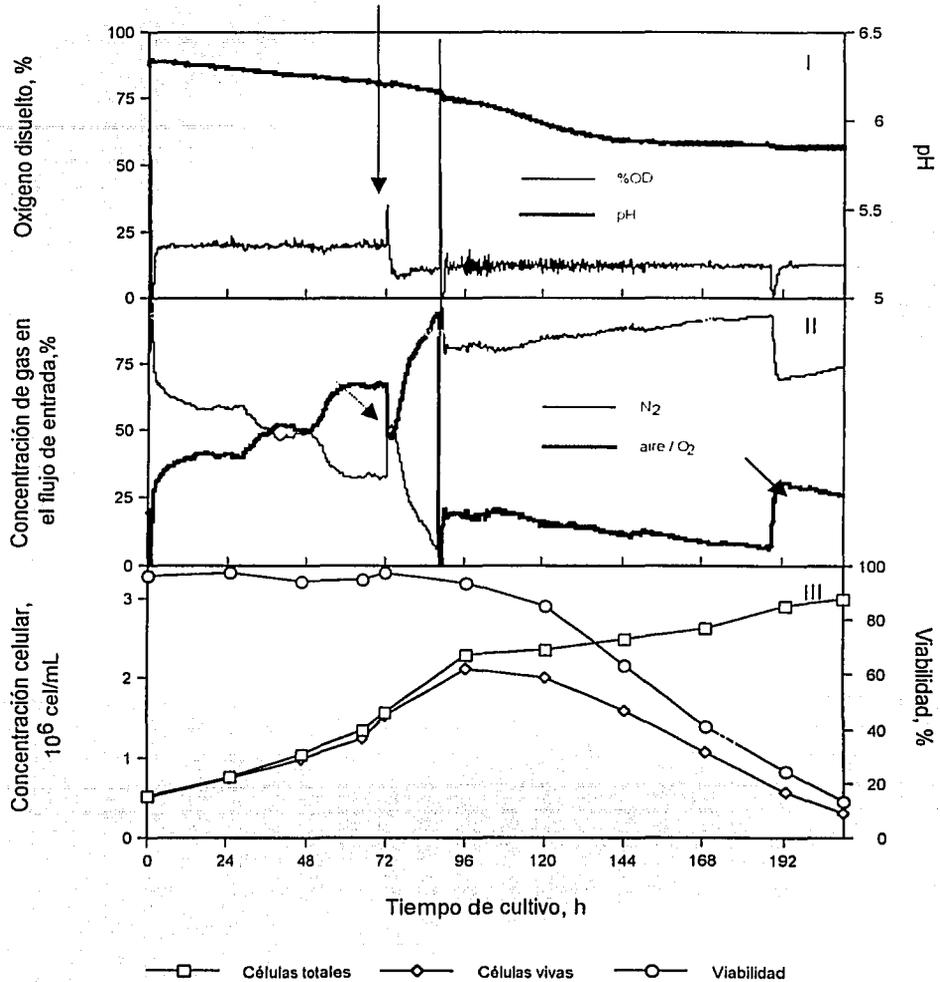


Figura 5.8 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 12%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha inclinada punteada a las 72 h indica el cambio de gas aire a O₂, mientras que la no punteada a las 192 h indica el cambio de O₂ a aire. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

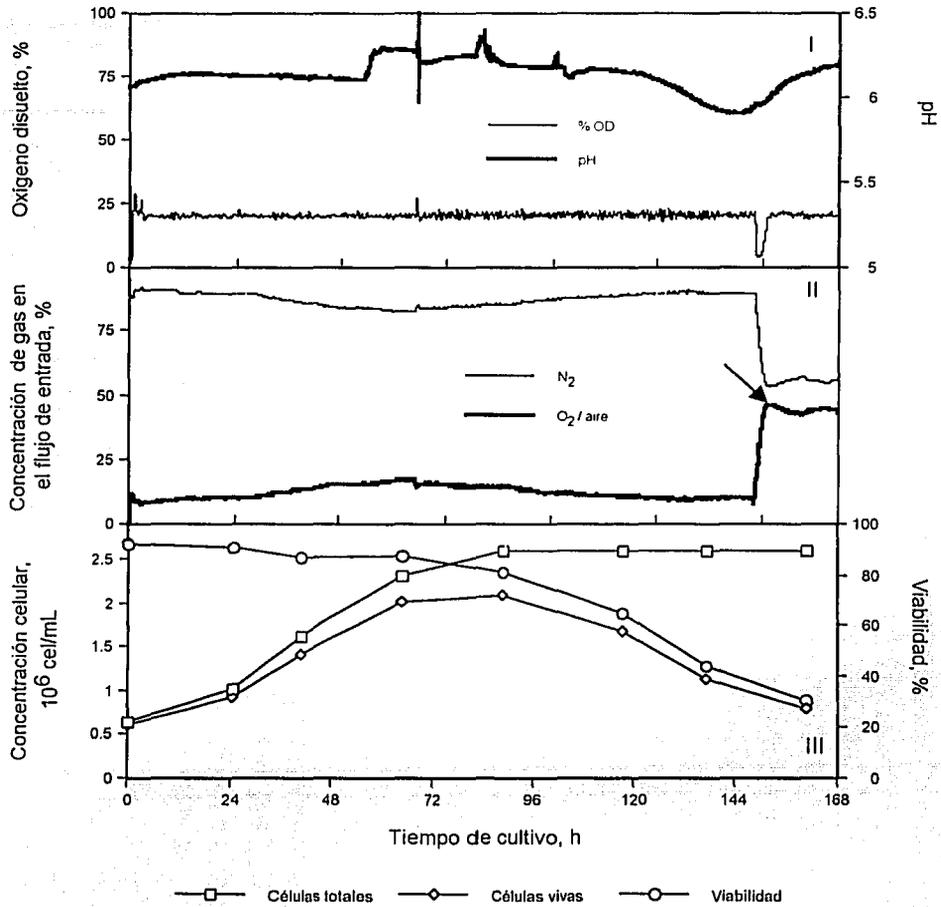


Figura 5.9 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 20%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha inclinada a las 148 h indica el cambio de gas O_2 a aire. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

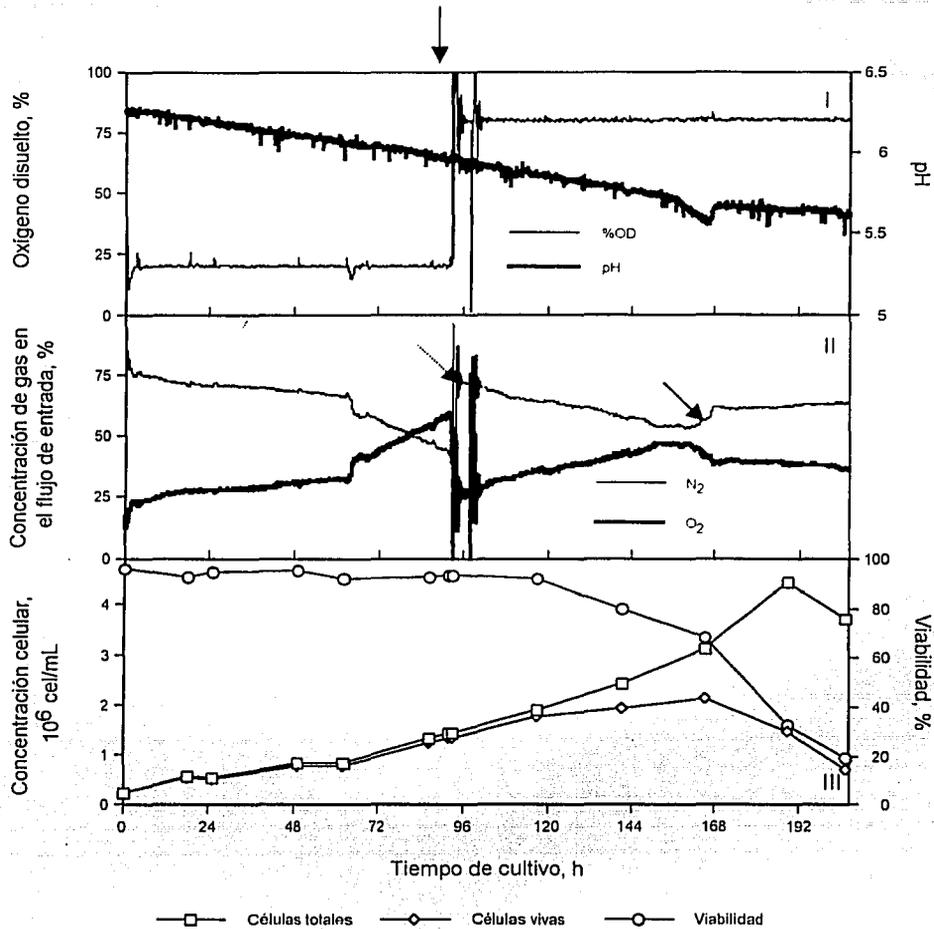


Figura 5.10 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 80%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha inclinada punteada a las 90 h indica el cambio de gas aire a O₂, mientras que la no punteada a las 168 h indica el cambio de O₂ a aire. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

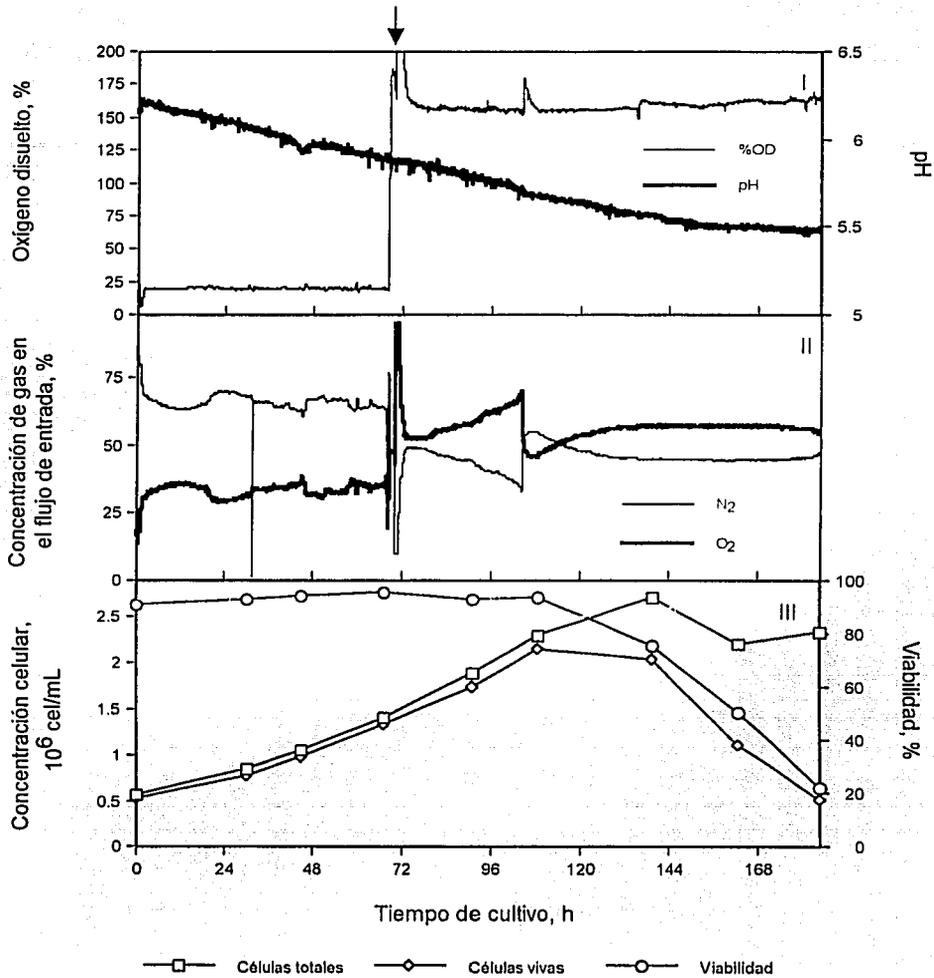


Figura 5.11 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 160%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

nutrientes del medio necesarios para formar más biomasa. El agotamiento de estos sustratos puede causar disminución en la concentración de proteína recombinante. En el caso contrario de emplear valores altos de MDI (>1), la población celular se infectaría totalmente desde el inicio y no lograría crecimiento adicional, limitando la cantidad de proteína recombinante producida. Además, otro punto importante es que a nivel industrial la cantidad de virus necesaria para infectar a MDI > 1 en un lote de producción no sería económicamente factible. Por lo tanto la MDI seleccionada es suficiente para asegurar una infección sincronizada de la población celular. Chico y Jäger (2000), observaron que el 100% de las células viables pueden ser ya consideradas como células infectadas a MDI de 1 a partir de 24 hpi.

Para la selección del TDI adecuado nos basamos en la experiencia obtenida por Radford *et al.*, 1997a; Vallazza y Petri, 1999 y Chico y Jäger, 2000. A TDI $< 1.5 \times 10^6$ cel/mL, las células se infectan durante fases muy tempranas de crecimiento y la concentración celular final alcanzada sería relativamente baja. Como consecuencia, la concentración de proteína recombinante sería limitada. A TDI $> 1.5 \times 10^6$ cel/mL, habría más probabilidad de encontrar el medio agotado de nutrientes, los cuales son necesarios para la producción de proteína recombinante. Todos los autores arriba mencionados confirmaron que la detección de proteína es muy baja a TDI $> 1.5 \times 10^6$ cel/mL comparado a valores menores. Por lo tanto, el cambio escalonado en la composición de los gases de entrada se realizó hasta que se obtuviera una concentración de células viables aproximada a 1.5×10^6 cel/mL y viabilidad mayor a 90% (panel I y III), tal y como se indica con la flecha vertical. A este valor de TDI, se infectó a MDI de 1 ufp/cel. A partir de este tiempo se tomaron muestras del cultivo aproximadamente cada 24 h, abarcando las fases de

crecimiento, estacionaria y muerte. La duración de los lotes infectados fue entre 120 y 144 hpi. El cultivo se cosechó al disminuir la viabilidad por debajo de 30% (panel III).

Al inicio de los cultivos, el pH fue de 6.2 y disminuyó paulatinamente durante la fase de crecimiento de las células (obsérvese en el panel I de las Figuras 5.6 a la 5.11 que inicialmente todos los cultivos fueron controlados a 20% de OD). Cuando se realizó el control a diferentes condiciones de OD, el pH inició en un valor cercano a 6. En algunos cultivos, el pH llegó a un valor final entre 5.5 y 6 (lotes controlados a 0, 3 y 12% de OD) ó a 6.25 (lotes controlados > a 20% de OD). **Estos perfiles de pH fueron muy diferentes a los obtenidos por los cultivos control, sin embargo, hay que considerar que la fase estacionaria fue más prolongada para los cultivos sin infección.** Para el caso de las células infectadas, el efecto de la infección fue más drástico sobre la viabilidad celular. La caída en viabilidad se hace evidente a las 72 hpi en todos los cultivos. Hasta la fecha, Wang *et al.* (1996) y Hu y Bentley (1999) son los únicos que han reportado perfiles de pH en cultivos de células Sf-9 infectadas. Los primeros comprobaron que en lotes controlados a 15 y 50% de OD existió una disminución en el valor de pH de 6.2 a 5.6 (valor alcanzado al final del cultivo). Sin embargo, el perfil de pH de un lote controlado a 25% de OD se mantuvo constante a lo largo de todo el cultivo (pH =6.2). En el caso de Hu y Bentley (1999), sus cultivos fueron controlados a valores >25% de OD y no observaron cambio en pH. El valor se mantuvo constante entre 6 y 6.1. Estos valores son comparables a los perfiles obtenidos en este estudio. A pH > 6.3 se ha comprobado que disminuye el rendimiento de proteína recombinante (Zhang *et al.*, 1994). Por lo tanto, no esperamos que el pH sea un parámetro de mayor peso en la expresión de la proteína recombinante en este estudio debido a que los valores registrados estuvieron por debajo de 6.3.

5.3.1 Efecto del oxígeno disuelto en el crecimiento celular

En las Figuras 5.12A y 5.12B se resumen las cinéticas de los 12 lotes infectados. Los datos corresponden al promedio de los cultivos mantenidos a cada condición de OD. Los datos individuales de cada uno de los 12 cultivos se anexan en el Apéndice E. En el panel I y panel II de las Figuras 5.12A y 5.12B se muestran los perfiles de concentración de células viables y viabilidad, respectivamente. La diferencia de los gráficos ilustrados en ambos paneles con respecto a lo mostrado en las Figuras 5.6-III hasta la 5.11-III, estriba en que sólo se tomaron en cuenta los datos obtenidos después del tiempo inicial de infección. Los datos obtenidos antes del tiempo inicial de infección no muestran diferencias relevantes debido a que todos los lotes fueron controlados inicialmente a 20% de OD. Estos datos calculados son las velocidades específicas de crecimiento y se anexan en el Apéndice D.

Para la cinética al 0% de OD (Figura 5.12A) se observa que la concentración de células vivas disminuye a partir del TDI. Por otro lado una parte de la población sobrevivió durante 5 días, lo cual observamos que las células aún infectadas llevan a cabo la anaerobiosis. Cabe mencionar que en estos cultivos a 0% de OD sólo se suministró nitrógeno para llegar al valor de OD deseado. Un experimento similar pero sin infección fue realizado por Palomares (1996) y observó el mismo efecto. Tal perfil sirve como cultivo control de nuestro experimento ya que las células no fueron infectadas y como consecuencia no hubo expresión de proteína recombinante (estas observaciones se verán con más detalle en las siguientes secciones).

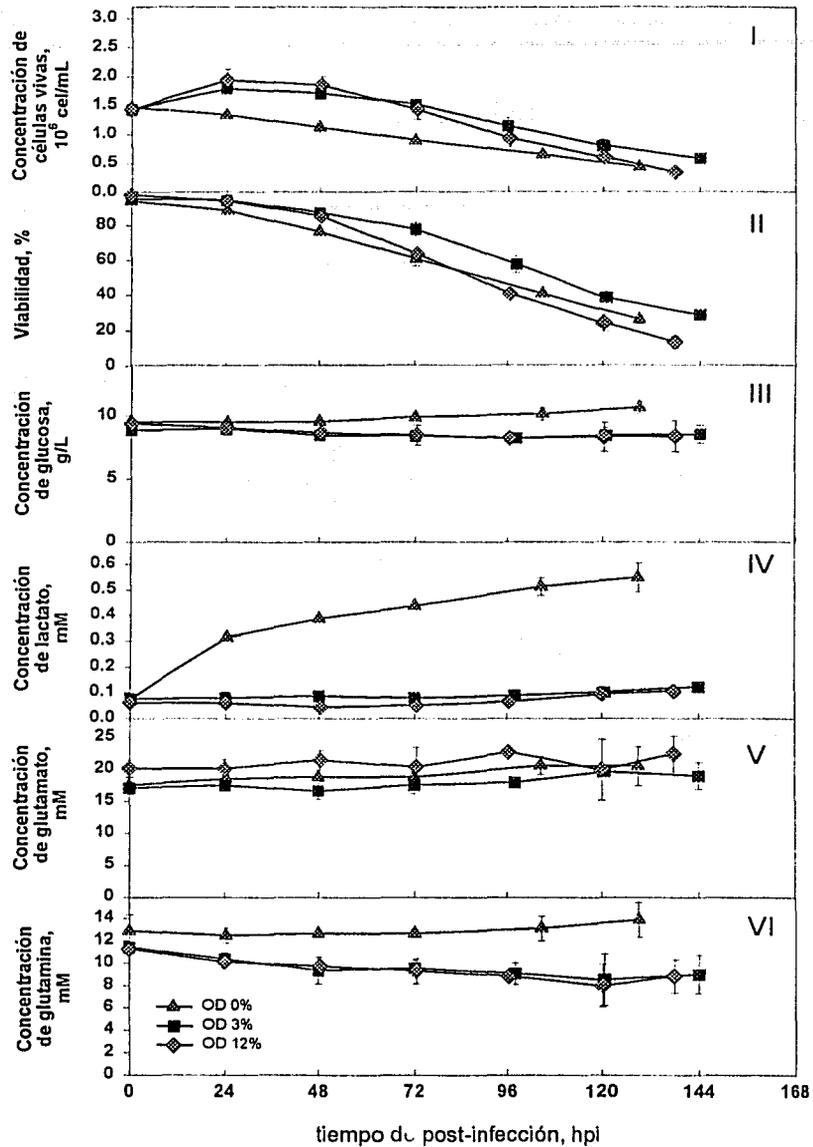


Figura 5.12A Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores. I. Concentración de células vivas, II. % viabilidad, III. Concentración de glucosa, IV. Concentración de lactato, V. Concentración de glutamato, VI. Concentración de glutamina. Las barras de error representan el rango obtenido a partir de 2 experimentos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

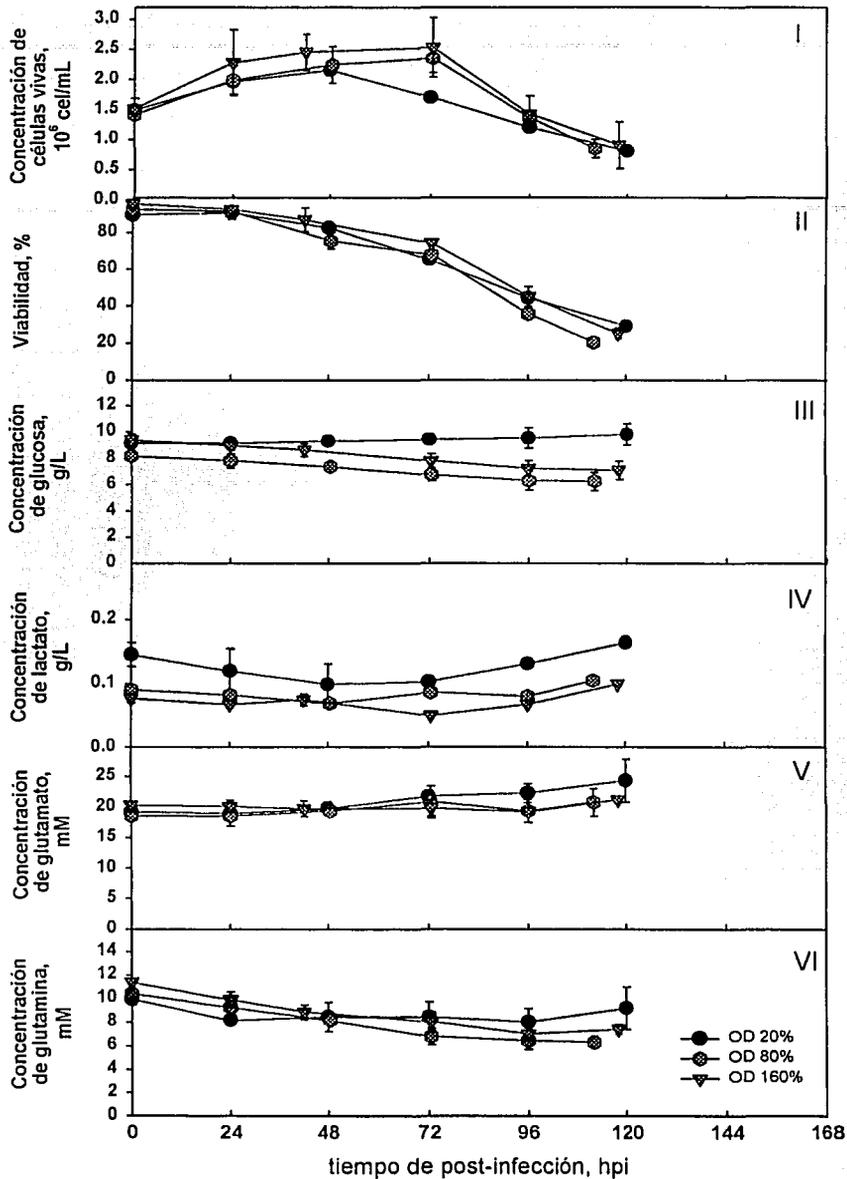


Figura 5.12B Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores. I. Concentración de células viables, II. % viabilidad, III. Concentración de glucosa, IV. Concentración de lactato, V. Concentración de glutamina. Las barras de error representan el rango obtenido a partir de 2 experimentos.

TESIS CON
FUELLA DE ORIGEN

La concentración máxima de células viables en cultivos controlados a 3 y 12% OD se logró a las 24 hpi y en el cultivo controlado a 20% OD fue a las 48 hpi. Para el caso de los cultivos controlados a 80 y 160% de OD, la concentración máxima se logró hasta las 72 hpi. Como se puede observar, a medida que la concentración de O₂ aumenta, se favorece positivamente la máxima concentración alcanzable de células viables. Por lo tanto, hay generación de más biomasa y por consiguiente podría esperarse que esto favoreciera la producción de proteína recombinante. Sin embargo esto no fue el caso para condiciones de O₂ superiores a 80% (ver resultados más adelante).

Todos los cultivos presentaron una correlación entre la caída drástica de concentración de células viables y en viabilidad (Figuras 5.12A-II y 5.12B-II). Se observó que la fase de muerte se retrasaba a medida que el OD aumentaba (24 hpi para 3 y 12%, 48 hpi para 20%, y 72 hpi para 80 y 160%). Actualmente no existen reportes previos donde se haya observado un cultivo infectado y controlado a 0% de OD.

En las Figuras 5.12A-III y 5.12B-III, se observan los perfiles de concentración de glucosa. En general, a medida que la concentración de OD incrementó, la concentración de sustrato disminuyó. Todos los cultivos iniciaron con una concentración inicial de glucosa entre 9 y 10 g/L. En los cultivos a 3, 12 y 20% de OD, a partir de las 24 hpi empieza a disminuir la concentración de glucosa. A las 96 hpi, la concentración disminuye hasta 8 g/L y a esta concentración se mantiene en las últimas horas de cultivo. Para el caso de los cultivos controlados a 80 y 160% de OD, la concentración final fue entre 6 y 7 g/L. En los cultivos controles casi se consumió la glucosa del medio. Por el contrario, para el caso de

los cultivos infectados no se consume totalmente la glucosa. Una comparación de las velocidades de consumo entre cultivos controles e infectados se mostrará con detalle más adelante en este trabajo.

En los cultivos controlados a 0% de OD, se observó que no existió disminución en la concentración de glucosa. Después de las 72 hpi ocurre un ligero incremento. La concentración promedio al final de cultivo fue de 10.5 g/L. Wang *et al.* (1996) suponen que incrementos en la concentración de glucosa se pueden deber a la hidrólisis de la sacarosa, lo cual se comprobó en este trabajo. El análisis de sacarosa fue realizado enzimáticamente utilizando la β -Fructosidasa, generando entre glucosa y fructosa. En la **Figura 5.13** se muestra el perfil comparativo entre las concentraciones de sacarosa y glucosa del lote controlado a 0% de OD. La concentración de sacarosa inicial en medio SF900-II fue alrededor de 2.1 g/L (concentración determinada por Radford *et al.* 1997a, Doverskog *et al.*, 2000). A lo largo del cultivo la concentración de sacarosa presentó ligeras variaciones, pero disminuyó claramente a partir de las 72 hpi. Radford *et al.*, 1997a, demostraron que la concentración de sacarosa no disminuye en cultivos de Sf-9 infectados y controlados a 50% de OD. Tal caso es contrario a lo observado en un cultivo sin suministro de oxígeno. El resultado obtenido a condiciones anóxicas no puede ser comparado con otros reportes, ya que no hay alguna referencia existente para cultivos infectados evaluada a tales condiciones. Se puede suponer que bajo condiciones de anoxia las células producen enzimas hidrolíticas no presentes a mayores concentraciones de OD, que degradan la sacarosa. Nótese que en términos molares, la caída de sacarosa corresponde al aumento de

glucosa, por lo que se puede inferir que no existió consumo de glucosa en el cultivo a 0% OD.

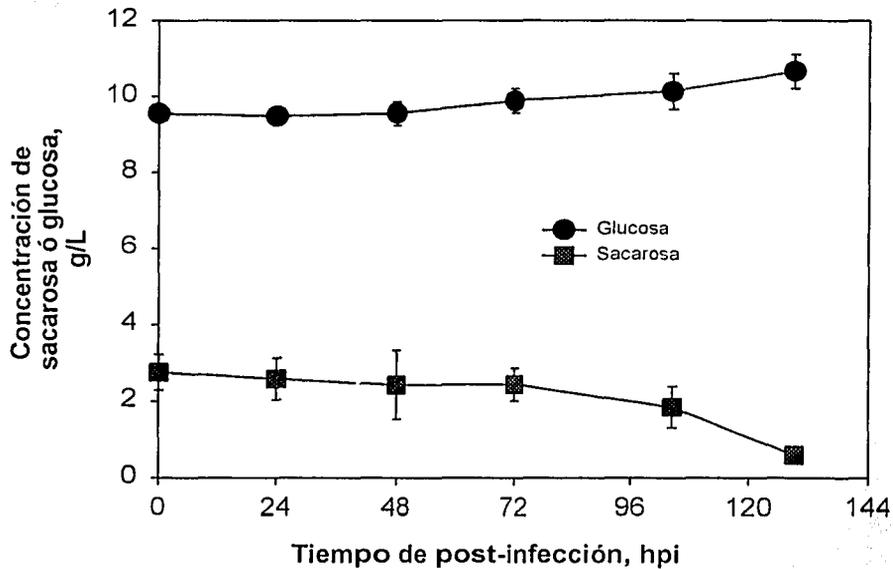


Figura 5.13 Perfil cinético de la concentración de glucosa y sacarosa en cultivos infectados y controlados a 0% de OD. Las barras de error representan el rango obtenido de 2 experimentos independientes.

Al analizar la Figura 5.12A-IV, se observa una alta concentración de lactato (0.55 g/L) en los cultivos controlados a 0% de OD. Lo extraño de este cultivo es que se generó lactato a pesar de que la concentración de glucosa no disminuyó a lo largo del cultivo. En este trabajo no se comprobó cual fue el sustrato que genera tal cantidad de lactato. Una suposición de la fuente de tal lactato es la posible hidrólisis de maltosa, y como consecuencia las unidades de glucosa generadas se convierten a lactato.

Alternativamente, la fructosa proveniente de la hidrólisis de sacarosa puede consumirse y convertirse a lactato.

Las concentraciones de lactato de los cultivos a OD mayores a 0% presentan un perfil relativamente similar entre sí. En los cultivos controlados a 3 y 12% de OD, la concentración de lactato se mantuvo constante en 0.1 g/L hasta el final del cultivo. Únicamente en cultivos controlados a 20, 80 y 160% OD se elevó la concentración de lactato cuando las células se encontraron en la etapa de muerte, tal y como ocurre en los lotes controles cuya concentración final pudo incrementarse hasta 6 veces lo observado en cultivos infectados. Rhiel *et al.* (1997) observaron un efecto similar en cultivos de SF-9 sin infectar e infectados. Coincidió que en nuestros cultivos a 20, 80 y 160% OD, la generación de lactato ocurre al haber un rápido decline en la viabilidad celular.

En las Figuras 5.12A-V y 5.12B-V, se muestra el perfil de concentraciones de glutamato. Los perfiles de las cinéticas no muestran gran relevancia en cultivos controlados de 0 a 12%, 80 y 160% de OD. Se mantienen relativamente constante en 17.5 ± 2.5 mM. En cambio, para el cultivo controlado a 20% de OD la concentración de glutamato se mantiene constante en 19 mM durante las primeras 48 hpi. Después de las 48 hpi, ocurre un ligero incremento en glutamato hasta $22.5 (\pm 2)$ mM. Esto correlaciona con el inicio de la fase de muerte e incremento de la concentración de lactato. Radford *et al.* (1997a), observaron en cultivos infectados y controlados a 50% de OD que hubo un decremento en la concentración de glutamato a lo largo del cultivo. El decremento de glutamato reportado por Radford *et al.* (1997a) correlacionó con el aumento en la

concentración de amonio, alanina y lactato y disminución en la concentración de glutamina. La única diferencia con respecto a nuestro trabajo, es que ellos infectaron los cultivos a TDI de 4.8×10^6 cel/mL usando una MDI de 1 ufp/cel y medio SF900-II. De acuerdo a las vías metabólicas propuestas para CI por Bédard *et al.*, 1993 (ver Figura 2.2), cuando se metaboliza glutamato se convierte a alanina y amonio, ambos metabolitos de desecho. **Para nuestro caso, el glutamato se incrementó en el lote controlado a 20% de OD posiblemente debido a la alanina presente en el medio (4.5 mM, Radford *et al.*, 1997a) aunque en nuestro estudio este metabolito no se midió (Observe en la Figura 2.2 que alanina más α -cetoglutarato se convierten a glutamato).**

En las Figuras 5.12A-VI y 5.12B-VI se muestran los perfiles de concentración de glutamina. El perfil de la glutamina fue semejante en todos los cultivos infectados a excepción para el cultivo a 0% de OD. Todos los cultivos parten con una concentración de glutamina alrededor de 11 (± 1) mM y terminan con un valor entre 7 y 8 mM. Un perfil semejante fue observado por Radford *et al.* (1997a) en cultivos infectados y controlados a 50% de OD empleando medio SF-900 II. En su caso, la concentración de glutamina inicia con 14 mM y baja al final hasta 8.7 mM. En dicho trabajo también se observa que la glutamina no es totalmente consumida por las células infectadas tal y como sucede en nuestro trabajo. Para la condición a 0% OD, la glutamina se mantuvo relativamente constante durante todo el cultivo.

5.4 Comparación entre los cultivos de células de insecto: infectados y no infectados

Los perfiles obtenidos de las cinéticas dan una idea de lo que puede ocurrir en los cultivos agitados de un sistema CI-BV. Para la tercera parte de la discusión de los resultados, se reagruparon los datos más sobresalientes de cada una de las cinéticas. Se compararon los resultados obtenidos en este estudio con valores reportados en la literatura para el sistema CI-BV. Además se discute sobre las posibles rutas metabólicas empleadas en el caso de las células infectadas.

5.4.1 Efecto del oxígeno disuelto sobre la concentración celular y expresión de la proteína recombinante

En la **Figura 5.14-I**, se muestra la expansión máxima de las células de insecto en cultivos infectados y sin infectar. Todos los datos se normalizaron con base a la TDI de 1.5×10^6 cel/mL. El perfil observado en el panel superior es semejante a un comportamiento de tipo Monod, obsérvese que a condiciones por debajo del 12% de OD existe limitación en el crecimiento de cultivos infectados. Aunque pocos autores confirman que no hay limitación del crecimiento celular por arriba del 5% de OD en células de insecto sin infectar, (Hensler y Agathos, 1994, Kamen *et al.*, 1996, Palomares y Ramírez, 1996), de los datos mostrados no se puede asegurar lo mismo para cultivos infectados.

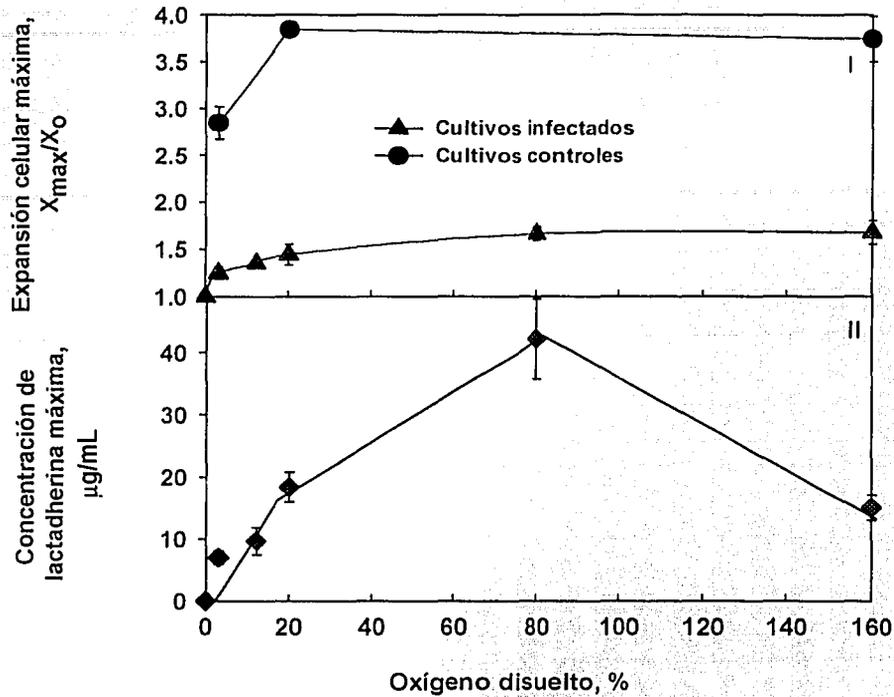


Figura 5.14 I. Expansión máxima de las células de insecto en cultivos infectados y no infectados. II. Concentración máxima de proteína recombinante producida a diferentes condiciones de oxígeno disuelto.

Los datos de la Figura 5.14-I, son comparables a lo que obtuvieron Zhang *et al.* (1994). Ellos encontraron en cultivos de *Bombyx mori* que existe limitación de oxígeno por debajo del 20% de OD y un crecimiento óptimo por arriba del 30%. Mientras que en células Sf-9, Jain *et al.* (1991) reportaron que el valor óptimo para el crecimiento en cultivos controlados es de 65% de OD.

De la información reportada para cultivos infectados, Scott *et al.* (1992), obtuvieron una expansión de 1.22 veces con respecto al TDI para un cultivo de Sf-9 infectado a MDI de 1 ufp/cel y controlado a 50% de OD. En nuestras condiciones evaluadas entre 20 y 80% de OD, existe expansión entre 1.44-1.66. El dato obtenido por ellos no se aleja de nuestros valores calculados considerando que emplearon una TDI de 2.7×10^6 cel/mL, la cual podría haber limitado el crecimiento por agotamiento de nutrientes aunque ellos no reportan metabolitos para asegurar tal suposición. **Los cultivos controles de nuestro trabajo se expandieron en más del doble comparados con los cultivos infectados.** Radford *et al.* (1997b) obtuvieron una expansión máxima celular de 1.375 a una MDI de 1 ufp/cel. **Obsérvese que por arriba del 12% OD, las expansiones son casi similares a excepción a lo observado por debajo de 12% OD. Se puede concluir que a bajas concentraciones de OD afecta la expansión celular.**

Anteriormente, Palomares (1996) determinó la constante de saturación de oxígeno (K_{O_2}) para sus cultivos de CI sin infectar. Además, en su trabajo determinó que la concentración crítica de OD fue limitante para el crecimiento celular por debajo del 5% OD. En los cultivos infectados de este estudio, no se pueden determinar tales parámetros a partir de velocidades específicas de crecimiento, las razones fueron comentadas en la sección de Materiales y métodos. A partir del gráfico obtenido para las expansiones celulares realizamos un ajuste hiperbólico para obtener una K_{O_2} aparente y asimismo estimar donde existe limitación del crecimiento celular por OD. Esto se observa con detalle en la **Figura 5.15**, a través del comportamiento típico de Monod se obtiene una expansión celular máxima de 1.6 y una K_{O_2} de 5%. En la literatura no existe estimaciones de tales

parámetros para cultivos infectados. En nuestros cultivos suponemos que existe limitación del crecimiento celular por debajo del 20% OD.

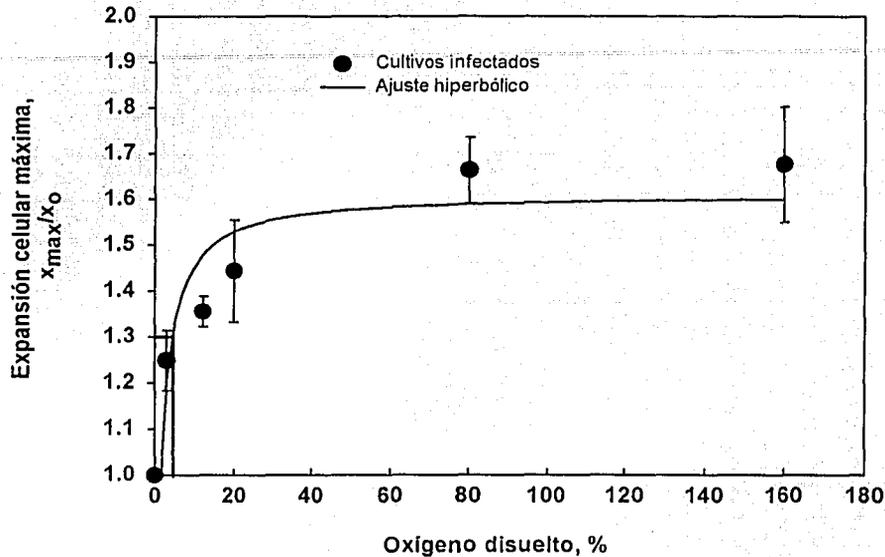


Figura 5.15 Efecto del OD sobre la expansión celular máxima de cultivos de CI infectados. Media y barras de error para dos cultivos. La línea continua en el panel sigue el modelo de Monod obtenido con estos datos, con una expansión máxima de 1.6 y una K_{O_2} de 5%.

En la Figura 5.14-II, se observa que la concentración de proteína recombinante es óptima a una concentración de 80% de OD. Esto contrasta con lo observado para la concentración celular ya que se mantiene relativamente constante para concentraciones de OD mayores de 20%. La concentración de proteína disminuyó 3.5 veces en condiciones de exceso de oxígeno, resultado que coincide con lo demostrado por Jain *et al.* (1991). La concentración máxima de proteína recombinante (pr) lograda en el sistema CI-BV fue

alrededor de 42 $\mu\text{g/mL}$, el cual corresponde al intervalo de producción en el sistema CI-BV reportado por Goosen, *et al.* (1992). Obsérvese que a condiciones limitantes de oxígeno disuelto, además de verse afectada la concentración celular, también se afectó considerablemente la producción de proteína recombinante. En condiciones anaeróbicas ya se mostró que las células no lograron expandirse, y como se muestra en la **Figura 5.14-II**, tampoco hubo producción de proteína recombinante a pesar de existir una cantidad considerable de células vivas durante un tiempo más que suficiente para la producción de proteína recombinante. **En condición oxidante (a 160% OD) hubo un efecto negativo sobre la expresión de proteína recombinante tal y como se observa en el perfil de la cinética.** Para observar con más detalle el perfil de concentraciones de proteína recombinante a diferentes niveles de oxígeno se muestra la **Figura 5.16**. En esta figura se puede observar que después de alcanzar la concentración máxima de proteína recombinante ocurre una disminución paulatina, con excepción de la condición a 80% OD donde el efecto es más drástico. Wang *et al.* (1996), observaron que por arriba del 20% OD, cuando se obtiene la máxima concentración de pr, se incrementa la actividad de proteasas. Naggie y Bentley (1998) observaron que por arriba de las 72 hpi la actividad proteolítica aumenta en un cultivo infectado de células Sf-9 presentando una correlación negativa en el rendimiento de β -galactosidasa. En nuestro estudio no se analizó la actividad proteolítica, pero seguramente es la responsable de la caída observada en pr a 80% OD.

Los efectos observados son similares a lo reportado en células procariotes para *Escherichia coli* y aunque el sistema es muy diferente al usado en este trabajo tiene ciertas semejanzas a comportamientos que varios autores han observado en el sistema CI-BV. En

Escherichia coli los niveles oxidativos y condiciones anóxicas pueden afectar la expresión de proteína recombinante bajo varios mecanismos moleculares (Konz *et al.*, 1998). A presiones elevadas de oxígeno puede existir daño celular por estrés oxidativo en el interior de la célula y asimismo oxidación de proteínas específicas y secuencias de nucleótidos. Los

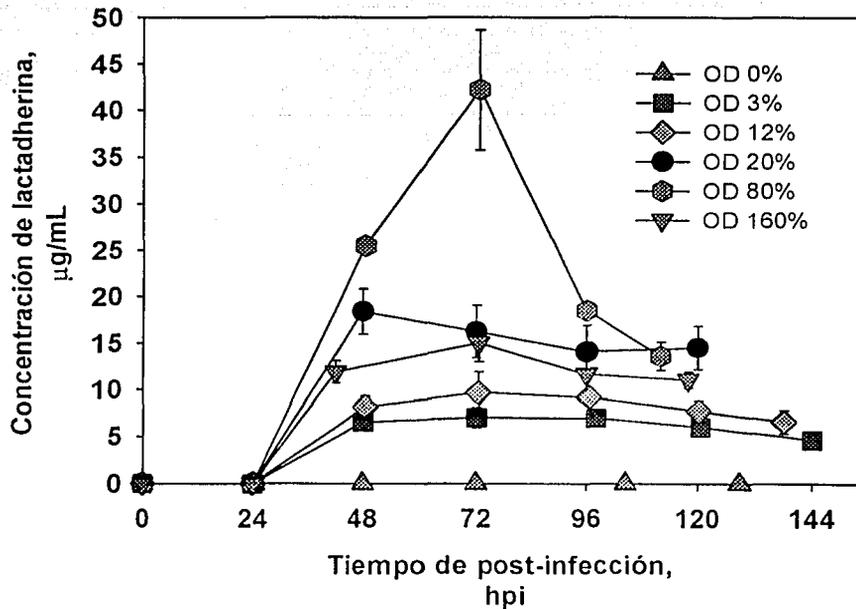


Figura 5.16 Perfil de concentraciones de proteína recombinante expresada en el sistema CI-BV a diferentes condiciones de oxígeno disuelto. Las barras de error representan el rango obtenido de 2 experimentos.

peróxidos de hidrógeno y de lípidos ó radicales libres generados en condiciones oxidantes son los compuestos implicados en la oxidación de proteínas, aminoácidos y DNA, conjugación y entrecruzamiento de proteínas. Algunas de las reacciones oxidativas en proteínas involucran la formación de grupos aldehído y cetona no muy comúnmente

encontradas en proteínas. Si el daño ocurre en algún residuo del sitio activo de proteínas el daño es letal. Para el caso de células de insecto infectadas, Wang *et al.* (2001), observaron incrementos elevados de hidroperóxidos de lípidos y carbonilos de proteína después de 72 hpi. Este estrés oxidativo correlacionó con la reducción de viabilidad celular. Además, Meneses-Acosta (2001) atribuye que el estrés oxidativo causa muerte celular y daño de ADN. **En nuestro trabajo pudo haber ocurrido acumulación de radicales libres que disminuyeron la concentración de pr producida en el cultivo controlado a 160% OD.**

Por otro lado, en el caso de cultivos de *Escherichia coli* controlados en condiciones anóxicas, el daño ocurre en las enzimas regulatorias del ciclo de Krebs causando disminución en la concentración de precursores que sirven para sintetizar aminoácidos. Además la ausencia de oxígeno puede causar inestabilidad en la replicación del plásmido. A estas condiciones controladas en bacterias es difícil comparar en células de insecto. En primer lugar, porque la limitación de aminoácidos no es problema en nuestro sistema empleado debido a que el medio es rico en aminoácidos. **Si la ausencia de oxígeno en bacterias es causante de inhibición de vías regulatorias del ciclo de Krebs podemos suponer que en CI-BV causa inhibición en el metabolismo de aminoácidos ya que ellos son los precursores de proteínas.** En cambio si el daño ocurre en plásmidos bacterianos, entonces el daño en el sistema CI-BV sería diferente, ya que las células de insecto aportan la maquinaria enzimática para que el virus se replique a través de plásmidos recombinantes. **En ausencia de oxígeno podría causar inestabilidad en la replicación del vector viral y como consecuencia no habría expresión de pr.**

5.4.2 Efecto del oxígeno disuelto sobre las velocidades específicas de consumo de sustratos y producción de proteína recombinante

En la **Figura 5.17**, se muestran las velocidades de consumo y generación de metabolitos tanto para cultivos sin infectar y cultivos infectados. En la **Figura 5.17-I y II**, se muestra el perfil de velocidades específicas de consumo de los sustratos glucosa y glutamina, respectivamente. **En cultivos infectados, la velocidad de consumo de glucosa es relativamente constante entre 3 y 160% OD mientras que es cero a 0% OD.**

Para los cultivos no infectados, por arriba del 20% OD, la velocidad específica de consumo de glucosa fue semejante a los cultivos infectados. **Para el cultivo no infectado y limitado de oxígeno (a 3% OD) el consumo de glucosa es mayor 2.65 veces con respecto al cultivo infectado y 1.7 veces mayor con respecto a los no infectados a OD > 12% .**

Los datos de los coeficientes metabólicos de glucosa se comparan con los datos obtenidos por algunos autores y se muestran en las **Tablas 5.1 y 5.2**. Como se observa, en algunos casos valores obtenidos por varios de los autores difieren a nuestros resultados. Alguna de las razones podría ser por el tipo de medio de cultivo empleado, a lo cual ya se había mencionado anteriormente que las concentraciones iniciales de glucosa pueden influir en el metabolismo de las células de insecto.

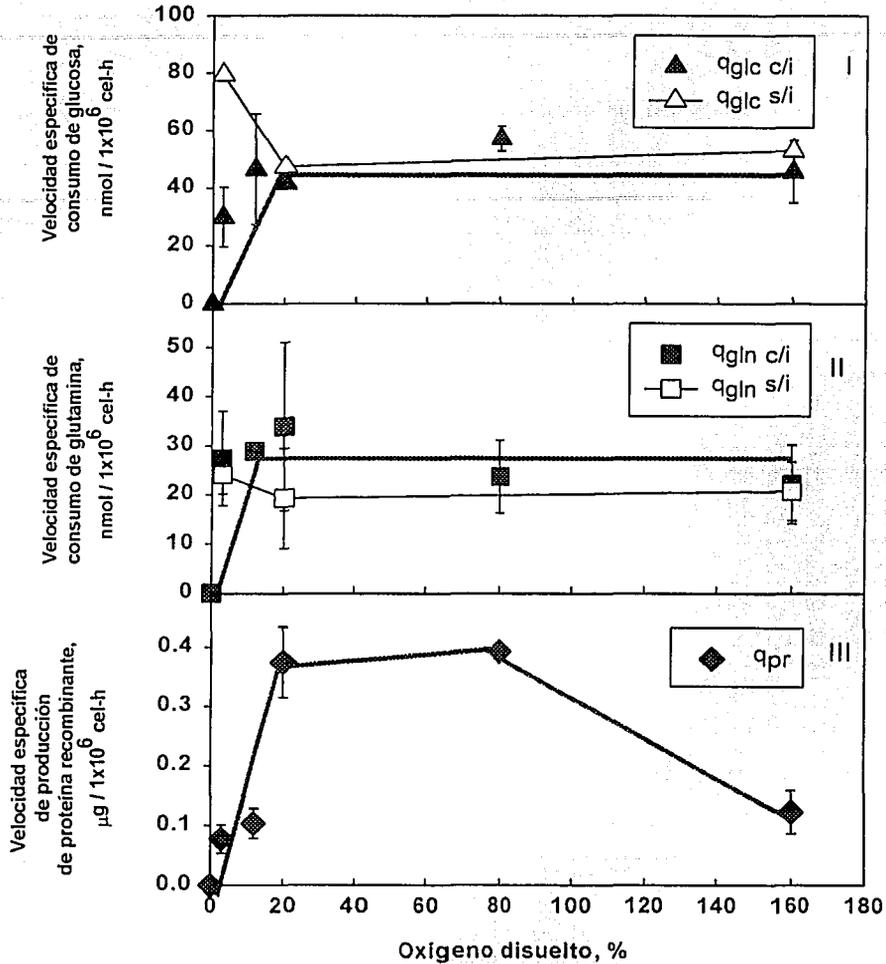


Figura 5.17 Efecto del oxígeno disuelto sobre las diversas velocidades específicas: I. Velocidades específicas de consumo de glucosa, II. Velocidades específicas de consumo de glutamina, III. Velocidades específicas de producción de proteína recombinante. Infectados (c/i) y sin infectar (s/i). Las barras de error representan el rango obtenido de 2 experimentos independientes. Líneas dibujadas sólo para mostrar tendencia.

El rango de consumo de glucosa en células de insecto sin infectar mostrado en la Tabla 5.1 va de 33 a 115 $\text{nmol glc} / 1 \times 10^6 \text{ cel-h}$, a lo cual nuestros valores caen

dentro del estimado. El perfil de nuestros experimentos sin infectar se asemeja al observado por Palomares (1996) comparando con sus valores calculados por arriba del 5% OD.

Tabla 5.1 Datos reportados de coeficientes metabólicos para células Sf-9 sin infectar (nmol glc ó gln / 1×10^6 cel-h)

% OD	q_{glc}	q_{gln}	Reporta...
15%	115	36	Rhiel y Murhammer, 1995
-	78	37	Mendonça <i>et al.</i> , 1999
50%	86	40	Rhiel <i>et al.</i> , 1997
50%	60	33	Wang <i>et al.</i> , 1996
25%	47	34	
15%	33	18	
30%	67	20	Palomares, 1996
10%	89	60	
5%	89	40	
2%	44	130	
160%	53±4	21±6	*Este trabajo
20%	47±17	19±10	
3%	79±1	24±4	

En cultivos infectados (Tabla 5.2), los coeficientes metabólicos de glucosa fueron muy similares a los datos reportados por otros autores, a pesar de que las MDI empleadas son diferentes. Varios autores han reportado un aumento en más del doble del consumo de oxígeno en el momento de infección (Kamen *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1992; Reuveny *et al.*, 1993; Hensler y Agathos, 1994; Kioukia *et al.*, 1995; Kamen *et al.*, 1996; Agathos, 1996). Sería entonces de esperarse que existiera un aumento correspondiente en el consumo de glucosa. No obstante, como se ha señalado esto no ocurrió, por lo que podríamos suponer que otro sustrato es el utilizado para soportar el aumento de consumo de oxígeno después de la infección.

Tabla 5.2 Datos reportados de coeficientes metabólicos para células Sf-9 infectadas (nmol glc ó gln / 1×10^6 cel-h)

% OD	MDI	Q_{glc}	Q_{gln}	Reporta...
50%	0.2	61	18	Rhiel <i>et al.</i> , 1997
22%	20	50	-	Wang <i>et al.</i> , 1993
15%	1	58	18	Rhiel y Murhammer, 1995
80%	5	68	27	Hu y Bentley, 1999
50%		72	29	
25%		55	16	
50%	5	60	31	Wang <i>et al.</i> , 1996
25%		45	49	
15%		49	24	
160%	1	46±11	22±8	*Este trabajo
80%		57±4	24±7	
20%		42±0	34±17	
12%		47±19	29±2	
3%		30±10	27±10	
0%		0	0	

En el panel II de la Figura 5.17, la velocidad específica de consumo de glutamina en cultivos infectados tiene el mismo perfil observado en el consumo de glucosa, es decir se mantiene relativamente constante entre 3 y 160% OD mientras que es cero a 0% OD. Para los cultivos infectados, por arriba del 3%, la velocidad de consumo de glutamina fue semejante a los cultivos no infectados.

El rango de consumo de glutamina en células de insecto sin infectar mostrado en la Tabla 5.1 va de 18 a 130 nmol glc / 1×10^6 cel-h, por lo que nuestros valores caen dentro de lo reportado en otros estudios. Al comparar nuestro resultados con lo publicado para células

no infectadas (Tabla 5.1) el valor controlado a 15% OD por Wang *et al.* (1996) se asemeja al valor calculado a 20% OD. Por otro lado, para células infectadas (Tabla 5.2) no se observaron diferencias en las velocidades de consumo de glutamina determinadas por otros autores a pesar de los diferentes valores de MDI empleados en sus cultivos.

En la Figura 5.17-III se muestra la velocidad específica de producción de proteína recombinante. Obsérvese que la máxima velocidad de producción de proteína se logró entre 20 y 80% de OD, y correspondía a $0.3925 (\pm 0.0135) \mu\text{g} / 1 \times 10^6 \text{ célula-h}$. Para fines prácticos, de acuerdo a lo observado en este estudio las concentraciones adecuadas para obtener una eficiente producción de pr son entre 20 y 80% OD. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que a una concentración de 80%, como se observó en la Figura 5.16, no es conveniente prolongar el cultivo por mas de 72 hpi, ya que existe degradación de pr.

5.4.3 Efecto del oxígeno disuelto sobre los rendimientos

Los rendimientos calculados para biomasa sobre glucosa y glutamina se muestran en la Figura 5.18-I y II, respectivamente. Los datos se encuentran anexos en el Apéndice F.

Las curvas de rendimiento de biomasa con respecto a glucosa y glutamina calculado para cultivos infectados presentaron un comportamiento similar a las curvas características de Monod. Por arriba de 12% de OD, el rendimiento de biomasa sobre glucosa (Figura 5.18-I) se mantiene constante para cultivos infectados y no infectados. Por

debajo de 20% de OD, el rendimiento de células por μmol de glucosa consumida se ve afectada negativamente.

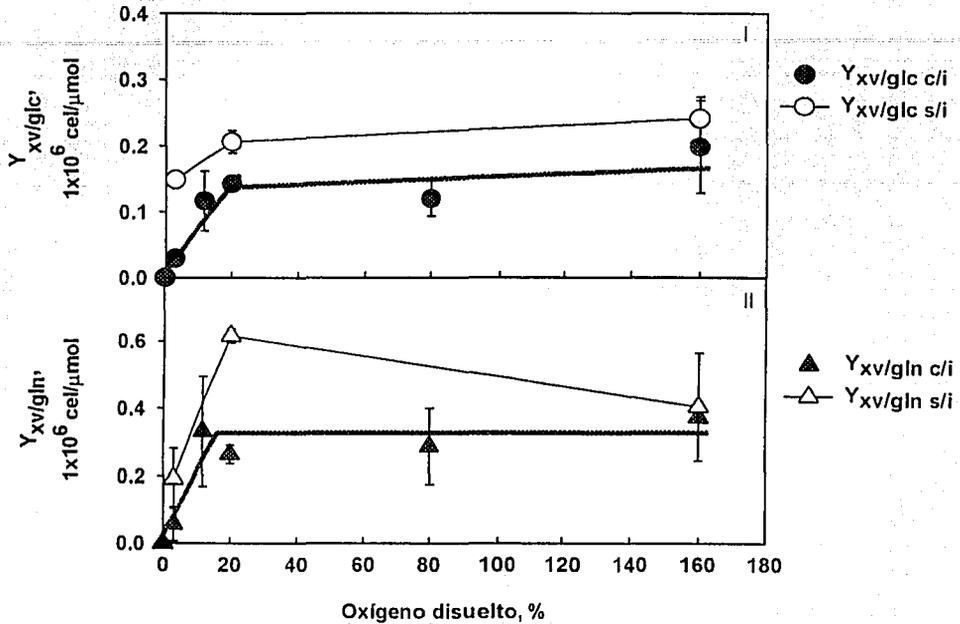


Figura 5.18 Efecto del oxígeno disuelto sobre rendimientos: I. Rendimiento biomasa sobre glucosa, II. Rendimiento biomasa sobre glutamina. Infectados (c/i) y sin infectar (s/i). Las barras de error representan el rango obtenido de 2 experimentos independientes. Líneas dibujadas entre puntos sólo para indicar tendencia.

El cultivo sin infectar y controlado a 3% de OD requirió menos cantidad de glucosa que los cultivos infectados para producir la misma cantidad de células. Es claro que, en condiciones limitantes de oxígeno aún la glucosa es un nutriente muy necesario no exclusivamente para crecimiento de células sino también para mantenimiento energético.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para el caso de cultivos no infectados (**Figura 5.17-II**), el rendimiento calculado de biomasa con respecto a glutamina al aumentar el OD de 3 a 20% OD, por lo que es evidente que a mayor OD aumenta la eficiencia de conversión de glutamina a biomasa. En el lote controlado a 160% disminuye un poco el rendimiento de biomasa sobre sustrato lo que nos lleva a suponer que a condiciones oxidantes, la glutamina no es dirigida en mayor parte a biomasa. Al comparar el cultivo controlado a 20% de OD sin infectar con el infectado, incrementa 3 veces la biomasa generada por glutamina consumida. **De los rendimientos calculados es claro que a medida que se limita por OD, el consumo de sustratos se orienta menos a la producción de biomasa y más hacia subproductos o mantenimiento celular que no se ve reflejado en aumento de la biomasa.**

En la **Figura 5.19-I y II**, se muestran los perfiles de los rendimientos calculados de la proteína recombinante producida por mol de glucosa o glutamina, o por célula generada, respectivamente. Los datos se encuentran anexos en el Apéndice F. Como se observa, los perfiles de rendimientos de pr tuvieron un comportamiento semejante al mostrado en la **Figura 5.14-II** para concentración máxima de pr. **En esta caso se observa que la mayor cantidad de pr producida por sustrato consumido o por célula generada ocurre en un valor óptimo de OD de 80%**

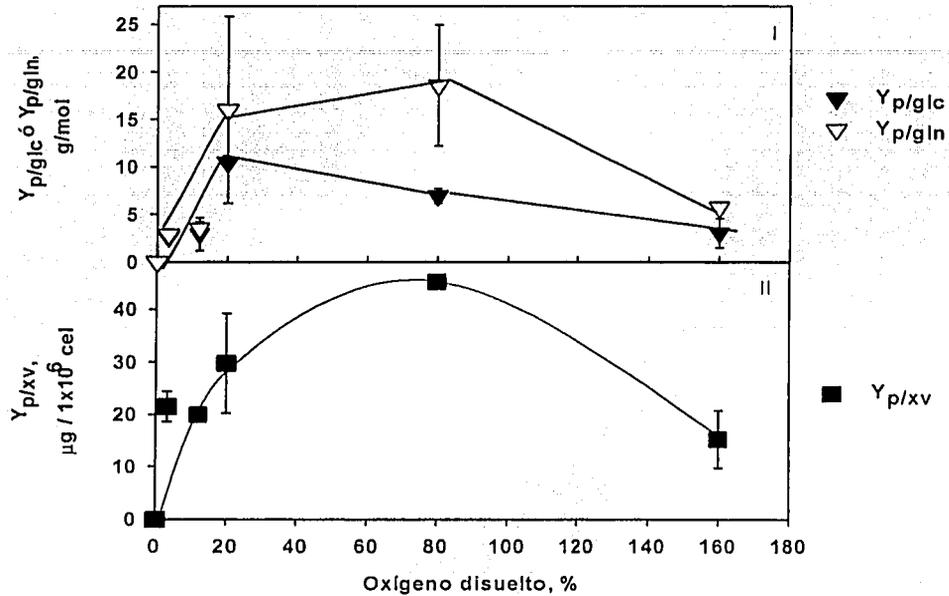


Figura 5.19 Efecto del oxígeno disuelto sobre rendimientos: I. Rendimiento de proteína recombinante sobre sustrato II. Rendimiento de proteína recombinante sobre biomasa. Las barras de error representan el rango obtenido de 2 experimentos independiente. Líneas dibujadas entre puntos sólo para indicar tendencia.

En la Figura 5.19-II, obsérvese que la cantidad de proteína recombinante por 1×10^6 células disminuye por debajo y por arriba del 80% de OD. Cuando no hay oxígeno, la producción de pr es nula.

Capítulo VI

Conclusiones

- Se demostró que en condiciones extremas de oxígeno disuelto, tanto valores altos como bajos, se afecta la concentración máxima y la velocidad específica de producción de proteína recombinante. La concentración de OD óptima fue de 80%.
- Se encontró que por debajo de 20% OD se vio afectada la velocidad de crecimiento de cultivos no infectados. Sin embargo, será necesario en un futuro realizar un barrido más fino en valores de OD entre 12 y 20% para determinar con precisión el valor de la OD crítica. La expansión celular se mantuvo constante a valores por arriba de 80% de OD, mientras que por debajo de tal valor, la expansión celular decayó hasta ser nula a 0%. Nuevamente, es necesario en un futuro realizar barridos más finos entre 20 y 80% de OD para determinar con mayor precisión en que punto la expansión celular empieza a depender más fuertemente del OD.
- Se observó que la velocidad específica de consumo de glucosa en cultivos infectados se mantiene constante entre 3 y 160% OD mientras que es cero a 0% OD. Para cultivos no infectados por arriba del 20% OD la velocidad específica de consumo de glucosa es similar a los cultivos infectados. Para el cultivo no infectado y controlado a 3% de OD el consumo de glucosa es mayor 2.65 veces con respecto al cultivo infectado. Es claro que en el segundo caso además de la limitación de oxígeno hay un efecto determinante debido a la infección viral.
- Se demostró que en condiciones anóxicas, el incremento de la concentración de glucosa es debido a la hidrólisis de sacarosa. Si realmente la sacarosa se está hidrolizando, suponemos que las células infectadas consumen algunos de sus residuos para mantenimiento energético. Esto sería

comprobado si se analizaran la mayoría de los carbohidratos del medio de cultivo ó las enzimas hidrolíticas de las CI. Tal evento nos sería de utilidad para detectar cultivos que se encuentran en ambientes anaeróbicos.

- Se observó que la velocidad específica de consumo de glutamina se mantiene constante para cultivos infectados y sin infectar por arriba del 3% mientras que es cero a 0% OD. No se observó una diferencia significativa en el consumo de glutamina entre cultivos infectados y no infectados.
- Se demostró que la concentración de lactato se mantuvo relativamente constante durante la fase de crecimiento para cultivos controles e infectados, excepto a 0% de OD. Se demostró que la generación de lactato en células infectadas ocurre a 0% de OD. En condiciones de OD por arriba del 20%, en cultivos infectados ocurre generación de lactato durante la fase de muerte.
- Se observó a partir de los perfiles generados para rendimiento de biomasa con respecto a glucosa se mantiene constante por arriba de 20% OD tanto en cultivos infectados como en no infectados. Lo mismo sucede para el rendimiento de biomasa con respecto a glutamina en cultivos infectados. En el cultivo infectado y controlado a 20% OD, el rendimiento de biomasa sobre glutamina incrementó 3 veces con respecto al cultivo control.

Capítulo VII

Perspectivas

Un punto importante por cubrir en un futuro en la caracterización de cultivos de células infectadas sería evaluar con mayor precisión la concentración crítica de OD para el crecimiento de células infectadas y expresión de pr. También sería conveniente evaluar un parámetro que no consideramos en nuestro estudio, el potencial Redox, debido a que nuestro sistema hizo un barrido en condiciones extremas de oxígeno disuelto. Sería interesante abordar tal tema en cultivos de células de insecto infectadas ya que los reportes publicados con respecto a ese tema son escasos. Otro punto interesante a evaluar sería la aplicación de este tipo de estudios a otra línea celular con el fin de obtener altas concentraciones de pr y asimismo evaluar efectos sobre el patrón de glicanos, moléculas que determinan la función específica de una proteína de interés terapéutico.

En reactores de gran escala se ha comprobado para cultivos bacterianos que existen gradientes de oxígeno los cuales causan limitaciones en el crecimiento. En estos cultivos el suministro de oxígeno es por burbujeo y es más eficiente la transferencia que en cultivos de células de insecto. El burbujeo de gases puede dañar drásticamente a la célula y por consiguiente los rendimientos de pr se verían afectados al disminuir la concentración de células viables. De tal forma es lógico esperar que en cultivos de células de insecto a gran escala se presenten problemas de transferencia de masa. Actualmente, el escalamiento descendente es una herramienta indispensable para simular diversos gradientes tales como oxígeno disuelto, pH, temperatura, etc. a escala laboratorio. Esta propuesta nos serviría para

evaluar los efectos de tales gradientes en concentraciones celulares y rendimientos de pr. Asimismo con los resultados obtenidos se propondrían estrategias de control para mejorar las concentraciones de los productos arriba mencionados. Todas las perspectivas en conjunto enriquecerán la información escasa que hasta la fecha se ha presentado para el sistema CI-BV.

VIII Bibliografía

- Agathos S.N. (1996). Insect cell bioreactors. *Cytotechnology*. 20:173-189.
- Aguilar-Aguila A., Valentinotti S., Galindo E., Ramirez, O.T. (1993). Desarrollo de un sistema amigable y versátil para adquisición de datos y control de biorreactores. *Biotecnología*. 3:S130-S139.
- Bédard C. Tom R, Kamen A. (1993). Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: Insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnology Progress*. 9: 615-624.
- Betenbaugh M., Ailor E., Whiteley, E.M., Tsu-An-Hsu. (1999) Insect cells and larvae, gene expression systems. *Encyclopedia of Bioprocess Technology Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. Flickinger, Michael C. y Drew S.W. Wiley Biotechnology Encyclopedias. 3:1457-1476.
- Caron A.W., Archambault J, Massie B. (1990). High-level recombinant protein production in bioreactors using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology and Bioengineering*. 70: 574-586.
- Chico E., Jägger V. (2000). Perfusion culture of baculovirus-infected BTI-Tn-5B1-4 insect cells: a method to restore cell-specific β -trace glycoprotein productivity at high cell density. *Biotechnology and Bioengineering*. 70:574-586.
- Clements A.N., Grace T.D.C. (1967). The utilization of sugars by insect cells in culture. *Journal of Insect Physiology*. 13:1327-1332.
- Couto J.R., Taylor M.R., Godwin S.G., Ceriani RL, Peterson JA. (1996) Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA-46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. *DNA and Cell Biology*. 15:281-286.
- Doran P.M. (1999). *Bioprocess engineering principles*. Ed. Academic Press. San Diego, CA, E.U.A.
- Doverskog M, Bertram E., Ljunggren J., Öhman L., Sennerstam R., Häggström L. (2000). Cell cycle progression in serum-free cultures of Sf9 insect cells: Modulation by conditioned medium factors and implications for proliferation and productivity. *Biotechnology Progress*. 16:837-846.
- Drews M., Paalme T., Vilu R. (1995). The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*. 40:187-198.

Ferrance J.P., Goel A. y Atai M.M. (1993). Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. *Biotechnology and Bioengineering*. 42:697-707.

González M. (2000). "Efecto de variables de cultivo sobre la producción de las proteínas recombinantes VP7 y VP4 de rotavirus en el sistema células de insecto-baculovirus". Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Goosen M.F.A. (1992a). Insect cell culture engineering: an overview. En: *Insect Cell Culture Engineering*. Goosen M.F.A., Daugulis A.J., Faulkner P. (Eds.). Ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, E.U.A. pp.1-16.

Goosen M.F.A. (1992b). Large-scale insect cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*. 3:99-104.

Grace T.D.C., Brzozowski H.W. (1966). Analysis of the amino acids and sugars in an insect cell culture medium during cell growth. *Journal of Insect Physiology*. 12:625-633.

Granados R.R. (1980). Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnology and Bioengineering*. 23:1377-1405.

Hensler W.T., Agathos S.N. (1994). Evaluation of monitoring approaches and effects of culture conditions on recombinant protein production in baculovirus-infected insect cells. *Cytotechnology*. 15:177-186.

Hu Y.C., Bentley W.E. (1999). Enhancing yield of infectious bursal disease virus structural proteins in baculovirus expression systems: Focus on media, protease inhibitors, and dissolved oxygen. *Biotechnology Progress* 15:1065-1071.

Jägger V., Kobold A. (1995). Propagation of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) and production of recombinant proteins with the baculovirus expression system using improved spinner flasks with membrane aeration. *Biotechnology Techniques*. 9:435-440.

Jain D., Ramasubramanian K., Gould S., Seamans C., Wang S., Lenny A., Silberklang M. (1991). Production of antistasin using the baculovirus expression system. In: *Expression systems and processes for rDNA products*. ACS Symposium Series No. 477. Hatch R., Gooche C., Moreira A., Alroy, Y. (Eds.). pp.97-110.

Kamen A.A., Tom R.L., Caron A.W., Chavarie C., Massie B., Archambault J. (1991) Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 38:619-628.

Kamen A.A., Bédard C., Tom R., Perret S., Jardín, B. (1996). On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 50:36-48.

Kioukia N., Nienow A.W., Emery A.N., Al-Rubeai M. (1995). Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. *Journal of Biotechnology*. 38:243-251.

Klöppinger M., Fertig G., Fraune E., Miltenburger H.G. (1990). Multistage production of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in insect cell cultures. *Cytotechnology*. 4:271-278.

Konz J.O., King J., Cooney C.L. (1998). Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnology Progress*. 14:393-409.

Lindsay DA, Betenbaugh, MJ. (1992) Quantification of cell culture factors affecting recombinant protein yields in baculovirus-infected insect cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 39: 614-618.

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

Maeda S. (1995). Further development of recombinant baculovirus insecticides. *Current Opinion Biotechnology*. 6:313-319.

Maiorella B., Inlow D. (1988). Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production. *Bio/Technology*. 6:1406-1410.

Mathews C.K., Van Holde K.E. (1999) *Bioquímica 2ª Edición*. Ed. Mc Graw Hill. Madrid, España.

Mendonça R.Z., Palomares L.A., Ramirez O.T. (1999). An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *Journal of Biotechnology*. 72: 61-75.

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

Michal, G. (1999). *Biochemical pathways. An atlas of biochemistry and molecular biology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Heidelberg, Alemania.

Miller, L.K. (1996). Insect viruses, *Fields Virology* (Fields, B.N., Knipe, D.M Howley, P.M. et al., eds), Lippincott – Raven, Philadelphia, E.U.A.pp.533-556

Miller W.M., Blanch H.W. (1991). Regulation of animal cell metabolism in bioreactors. *Animal cell bioreactors*. Ho, C.S. y Wang., D.I.C. Ed. Butterworth-Heinemann. Stoneham, MA, EUA.

Naggie S. Y Bentley W.E. (1998) Appearance of protease activities coincides with p10 and polyhedrin-driven protein production in the baculovirus expression system: effects on yield. *Biotechnology Progress*. 14:227-232.

Newburg D.S., Peterson J.A., Ruiz-Palacios G.M., Matson D.O., Morow A.L., Shults J., Guerrero M.L., Chatuverdi P., Newburg S.O., Scallan C.D, Taylor M.R., Ceriani R.L., Pickering L.K. (1998) Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet*. 9110: 1160-1164.

Öhman L, Ljunggren J, Häggström L. (1995). Induction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43: 1006-1013.

O'Reilly D.R. Miller L.K. Luckow V.A. (1994). *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Ed. Oxford University Press., Nueva York.

Palomares, L.A. (1996) "Caracterización cinética y metabólica de cultivos de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9): Hacia el desarrollo de estrategias de control". Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Palomares L.A, Ramírez O.T. (1998). Insect cell culture: Recent advances, bioengineering challenges and implications in protein production. En: *Advances in Bioprocess Engineering II*. Galindo, E. y Ramirez, O.T. (Eds). Ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 25-52.

Palomares L.A., González M., Ramírez O.T. (2000) Evidence of Pluronic-F68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 324-331.

Palomares L.A., Ramírez O.T. (2001) El sistema células de insecto-baculovirus: una alternativa poderosa para la producción de pseudopartículas virales y otras proteínas recombinantes. *BioTecnología*. 6: 16-29.

Palomares L.A., Estrada-Mondaca, S., Ramírez O.T. (2002a) "Principles and applications of the insect cell-baculovirus expression vector system" En: *Cell culture technology for pharmaceutical and cellular therapies*, Ozturk, S. y Hu, W.S., (Eds.). Marcel Dekker, Nueva York, (En Prensa).

Palomares L.A., Joosten C.E., Hughes P.R., Granados R.R. y Shuler M.L. (2002b) A novel insect cell line capable of complex N-glycosilation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnology Progress*. (En Prensa).

Quintero R. (1993) *Ingeniería Bioquímica, Teoría y aplicaciones*. Ed. Alhambra Mexicana. México, D.F.

- Radford, K.M, Reid S., Greenfield P.R. (1997a). Substrate limitation in the Baculovirus expression vector system. *Biotechnology and Bioengineering*. 56: 32-44.
- Radford K.M., Cavegn C., Bertrand M., Bernard A.R., Reid S., Greenfield P.F. (1997b). The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: secreted and non-secreted products. *Cytotechnology*. 24: 73-81.
- Ramírez O.T., Mutharasan R. (1990). Cell cycle and growth phase dependent variations in size distribution, antibody productivity and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 36: 839-848.
- Reuveny S., Kemp C.W., Eppstein L., Shiloach J. (1992) Carbohydrate metabolism in insect cell cultures during cell growth and recombinant protein production. *Annals New York Academic Science*. 665:230-237.
- Reuveny S., Kim Y.J., Kemp C.W., Shiloach, J. (1993). Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38: pp.619-623.
- Rhiel M., Murhammer D.W. (1995). The effect of oscillating dissolved oxygen concentrations on the metabolism of a *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AE clonal isolate. *Biotechnology and Bioengineering*. 47: 640-650.
- Rhiel M., Mitchell-Logean C.M., Murhammer, D.W. (1997) Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High FiveTM) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 55:909-920.
- Schlaeger E.J. (1996) Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology* 20:57-70.
- Scott R.I., Blanchard J.H., Ferguson C.H.R. (1992) Effects of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) insect cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 14: pp. 798-804.
- Smith G.E., Summers M.D., Fraser M.J. (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology* 3: 2156-2165.
- Taticek R.A. y Shuler M.L. (1997) Effect of elevated oxygen and glutamine levels on foreign protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system. *Biotechnology and Bioengineering*. 54: 142-152.
- Tsao E.I., Mason M.R., Cacciuttolo M.A., Bowen S.H. (1996) Production of parvovirus B-19 vaccine in insect cells co-infected with double baculoviruses. *Biotechnology and Bioengineering*. 49:130-138.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Vallazza M., Petri T. (1999) Optimization of the production of triabin, a novel thrombin inhibitor, in High FiveTM insect cells infected with a recombinant baculovirus. *Cytotechnology* 29:85-92.

Van Lier F.L.J., Vlak J.M., Tramper J. (1992) Production of baculovirus-expressed proteins from suspension cultures of insect cells. In *Animal Cell Biotechnology* Spier, R.E., Griffiths, J.B. (Eds.) Academic Press, E.U.A. 5: 169-187.

Vaughn J. (1999) Insect cell culture, protein expression. *Encyclopedia of Bioprocess Technology Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. Flickinger M.C., Drew S.W. (Eds.). Ed. John Wiley and Sons Biotechnology Encyclopedias. Nueva York. 3:1444-1457.

Wang M.Y., Vakharia V., Bentley W.E. (1993). Expression of epoxide hydrolase in insect cells: A focus on the infected cell. *Biotechnology and Bioengineering*. 42: 240-246.

Wang M.Y., Pullian T.R., Valle M., Vakharia V.N., Bentley W.E. (1996). Kinetic analysis of alkaline protease activity, recombinant protein production and metabolites for infected insect (Sf-9) cells under different DO levels. *Journal of Biotechnology*. 46:243-254.

Wang Y., Oberley L.W. y Murhammer D.W. (2001). Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*. 31: 1448-1445.

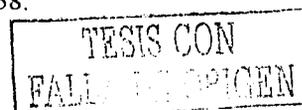
Yamaji H., Tagai S., Fukuda H. (1999). Optimal production of recombinant protein by the baculovirus-insect cell system in shake-flask culture with medium replacement. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87:636-641.

Yamshchikov G.V., Ritter G.D., Vey M., Compans R.W. (1995). Assembly of HIV virus-like particles containing envelope proteins using a baculovirus expression system. *Virology* 214:50-58.

Yang J.D., Gecik P., Collins A., Czarnecki S., Hsu H.H., Lasdun, A., Sundaram R., Muthukumar, G., Solberklang M. (1996). Rational scale-up of a baculovirus-insect cell batch process based on medium nutritional depth. *Biotechnology and Bioengineering* 52:696-706.

Yolken R.H., Peterson J.A., Vonderfecht S.L., Fouts E.T., Midthun K, Newburg D.S. (1992). Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *Journal of Clinical Investigation* 90: 1984-1991.

Zhang J., Kalogerakis N., Behie L.A. (1994). Optimization of the physiochemical parameters for the culture of *Bombyx mori* insect cells used in recombinant protein production. *Journal of Biotechnology*. 33: 249-258.



Apéndice A

Técnicas

A-1 Determinación del título viral: punto de dilución final ó "end point dilution"

Este método se lleva a cabo por duplicado utilizando placas de 96 pozos. Las células utilizadas deben encontrarse en fase exponencial de crecimiento con una viabilidad mayor al 95%.

- 1.- Se prepara un inóculo de células en medio SF900-II. La concentración del inóculo es de 1×10^5 cel/mL.
- 2.- Poner 100 μ L de medio de cultivo con células por cada pozo; luego colocar las placas en la incubadora a 27°C para que las células se adhieran a la superficie.
- 3.- Realizar diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-8} del virus a titular (50 μ L del virus en 450 μ L de medio); colocar 10 μ L de cada dilución por pozo (en 10 columnas) dejando como pozos control (sin infectar) 2 columnas de pozos.
- 4.- Las placas son incubadas a 27° C por 10 días. Para evitar la deshidratación se recomienda que en la superficie de las placas se coloquen paños húmedos y se protejan en bolsas de plástico selladas.
- 5.- Comparar la morfología celular (tamaño, apariencia y confluencia de los pozos expuestos al virus contra el control. Cada pozo que sea infectado es marcado como positivo.

TRABAJOS CON
FALLA DE ORIGEN

6.- Determinar el número de pozos infectados y no infectados en cada dilución realizada.

7.- Calcular la **Dosis Infecciosa en Cultivos de Tejidos** (denominada por sus siglas en inglés como, $TCID_{50}$). La $TCID_{50}$ se calcula a partir de la dilución viral correspondiente al 50% de cultivos que son infectados.

8.-El título viral se determina como el recíproco de la $TCID_{50}$ calculada, multiplicado por un factor de 0.69 (concentración promedio de unidades infecciosas en la dosis empleada). La unidad del título viral está expresada en, ufp/mL (O'Reilly *et al.*, 1994).

A-2 Determinación de sacarosa: hidrólisis por β -fructosidasa

Preparación del amortiguador de citratos 0.32 M pH 4.6:

1. Pesar 0.197 g de ácido cítrico y disolver en 50 mL de agua destilada.
2. Pesar 9.1 g de citrato de sodio y llevar a un volumen de 50 mL con agua destilada en un matraz aforado.
3. Adicionar la base al ácido hasta alcanzar un pH de 4.6.

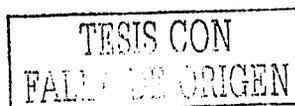
Preparación de la solución enzimática:

1. Pesar 20 mg de β -fructosidasa (Boehringer Mannheim, 150,000 U/ 487.1mg liofilizado) y disolver en 4 mL de amortiguador de citratos.

Determinación de sacarosa:

La concentración de sacarosa en el medio Sf-900 II es de 2 g/L. Se recomienda realizar diluciones 1/25 en las muestras que se van a analizar.

1. Medir por YSI la glucosa inicial en muestras.
2. Tomar 0.9 mL de muestra problema con un rango de concentración de 0.1 a 2g/L.
3. Mezclar con 0.1 mL de la solución enzimática.
4. Incubar 10 min a temperatura ambiente (27°C).
5. Medir nuevamente glucosa en el YSI.
6. Realizar el balance correspondiente a sacarosa considerando la dilución realizada y las concentraciones iniciales y finales de glucosa.



Apéndice B

Memorias de cálculo

B-1 Cuantificación de proteína recombinante

La cuantificación de la proteína se realizó utilizando el método denominado densitometría.

Este método consiste en:

1. Escanear el gel obtenido de la electroforesis.
2. Utilizar el programa de análisis de imágenes NIH image 1.61 para cuantificar la magnitud del área (A) e intensidad (I) de cada banda seleccionada.
3. Seleccionar las bandas correspondientes al marcador de peso molecular, así como a la proteína recombinante. Esta selección se realiza a partir de un recuadro que delimita la zona donde está la proteína de interés y además se delimita a través de la herramienta a mano alzada del programa de análisis de imágenes.
4. Promediar los parámetros obtenidos a partir de ambas selecciones.
5. Utilizar estos parámetros y teniendo al estándar como referencia se realizan los cálculos correspondientes.

Se conoce la concentración que se cargó del estándar (15 μL de una solución de albúmina a 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por lo que el valor correspondiente al producto de $A \cdot I$ corresponderá a la masa de marcador cargada. Por ejemplo, cargando 2 μg de estándar se obtiene una $(A \cdot I)$ promedio de 17,221. Entonces, si el $(A \cdot I)$ de la muestra es de 5,027, la cantidad de la muestra se calcula como:

$$\text{Muestra} = \frac{2 \mu\text{g} * 5,027}{17,221} = 0.584 \mu\text{g}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ya que el volumen de muestra cargado en cada pozo del gel es de 10 μL provenientes de una solución de 1 mL de búffer donde se resuspendió la pasta celular obtenida de centrifugar 4.5 mL de medio de cultivo, entonces la concentración de proteína de la muestra en el ejemplo anterior será:

$$\text{Concentración de proteína en muestra} = \frac{0.584 \mu\text{g} * 1 \text{ mL} * 1000 \mu\text{L}}{10 \mu\text{L} * 4.5 \text{ mL} * 1 \text{ mL}} = 13 \mu\text{g/mL}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B-2 Cálculo del índice de viabilidad

El cálculo se ejemplifica con datos de una cinética típica de producción de lactadherina.

1.-Promediar la concentración de células viables de la cinética a cada intervalo de tiempo (cel/L).

Tiempo (hpi)	x_t (cel/L)	x_t promedio (cel/L)
0	1.33E+09	
24	1.75E+09	1540000000
48.5	1.94E+09	1845000000
72.5	2.11E+09	2025000000
96	1.45E+09	1780000000
112	7.00E+08	1075000000

2.-Calcular la diferencia de los valores de tiempo a cada intervalo (h).

Tiempo (hpi)	x_t (cel/L)	x_t promedio (cel/L)	Delta tiempo (h)
0	1.33E+09		
24	1.75E+09	1540000000	24
48.5	1.94E+09	1845000000	24.5
72.5	2.11E+09	2025000000	24
96	1.45E+09	1780000000	23.5
112	7.00E+08	1075000000	16

3.-Calcular el producto de los valores calculados en los dos pasos anteriores.

Tiempo (hpi)	x_t (cel/L)	x_t promedio (cel/L)	Delta tiempo (h)	x_t promedio * Delta tiempo (cel-h/L)
0	1.33E+09			
24	1.75E+09	1540000000	24	36960000000
48.5	1.94E+09	1845000000	24.5	45202500000
72.5	2.11E+09	2025000000	24	48600000000
96	1.45E+09	1780000000	23.5	41830000000
112	7.00E+08	1075000000	16	17200000000

4.-Calcular el índice de viabilidad (acumulando el producto calculado en el paso 3).

Tiempo (hpi)	x_t (cel/L)	x_t promedio (cel/L)	Delta tiempo (h)	x_t promedio * Delta tiempo (cel-h/L)	Índice de viabilidad (cel-h/L)
0	1.33E+09				
24	1.75E+09	1540000000	24	36960000000	36960000000
48.5	1.94E+09	1845000000	24.5	45202500000	82162500000
72.5	2.11E+09	2025000000	24	48600000000	1.31E+11
96	1.45E+09	1780000000	23.5	41830000000	1.73E+11
112	7.00E+08	1075000000	16	17200000000	1.90E+11

B-3 Cálculo de la velocidad específica de producción de proteína recombinante

De la ecuación 4.6, es posible determinar el parámetro β como la pendiente de una gráfica de concentración de proteína recombinante contra índice de viabilidad:

$$p - p_0 = \beta \cdot \int_0^t x_v \cdot dt$$

$y = m \cdot x$

donde,

p = concentración de proteína recombinante en el tiempo t

p_0 = concentración de proteína recombinante en el tiempo cero

$\beta = q_p$, velocidad específica de producción de proteína recombinante

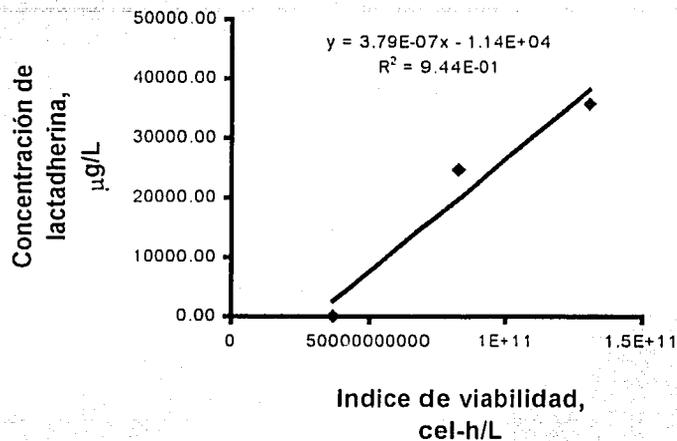
$\int x_v dt$ = índice de viabilidad

El cálculo de β se ejemplifica con una cinética típica de producción de lactadherina y se realiza mediante el siguiente procedimiento:

1.-Graficar sólo los puntos hasta donde se logra la máxima producción de proteína recombinante. En el eje x , índice de viabilidad y en el eje y , concentración de proteína recombinante.

[Proteína]	Índice de viabilidad
$\mu\text{gP/L}$	(cel-h/L)
0.00	36960000000
24742.28	82162500000
35744.48	1.31E+11
19067.40	1.73E+11
12057.49	1.90E+11

2.-Realizar una regresión lineal



A cada valor calculado en todas las cinéticas se le multiplica el factor de 1×10^6 para que la unidad final reportada sea , $\mu\text{g} / 1 \times 10^6 \text{ cel-h}$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B-4 Cálculo de la velocidad específica de consumo de glucosa durante la fase de producción

De la ecuación 4.7, es posible determinar el parámetro β como la pendiente de una gráfica de concentración de glucosa contra índice de viabilidad:

$$s_0 - s = \beta \cdot \int x_v \cdot dt$$

$\underbrace{\hspace{1.5cm}}_y = \underbrace{\beta}_{m} \cdot \underbrace{\int x_v \cdot dt}_x$

donde,

s_0 = concentración de sustrato en el tiempo cero

s = concentración de sustrato en el tiempo t

$\beta = q_s$, velocidad específica de consumo de sustrato

$\int x_v dt$ = índice de viabilidad

Los cálculos se ilustran con datos de la misma cinética que la empleada en el Apéndice B-

2. El cálculo de β se realiza mediante el siguiente procedimiento:

1.-Calcular el delta de glucosa, considérese el valor inicial de glucosa (tiempo cero de la cinética)

$\Delta \text{glc} = [\text{glucosa inicial}] - [\text{glucosa en el tiempo } t]$.

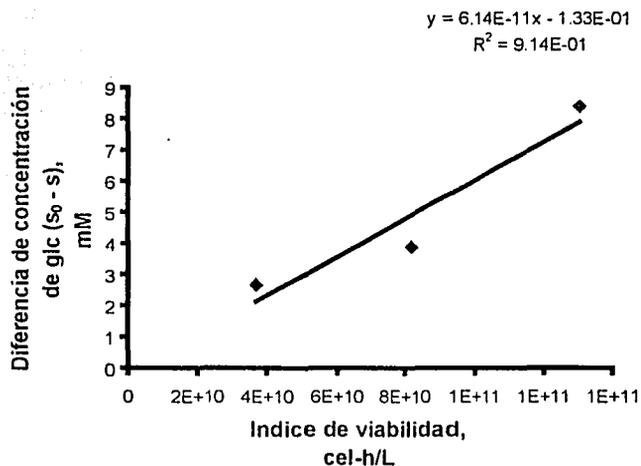
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.-Graficar sólo los puntos hasta donde se logra la máxima generación de células viables.

Nota: en algunos casos como los cultivos controlados a 3 y 12% OD, se eligieron máximo 3 puntos para disminuir el error en los cálculos realizados. En el eje x, índice de viabilidad y en el eje y, delta de glucosa.

Índice de viabilidad (cel-h/L)	[glc] (mM)	Delta [glc] (mM)
	43.22	
36960000000	40.56	2.67
82162500000	39.33	3.89
1.31E+11	34.83	8.39
1.73E+11	38.94	4.28
1.90E+11	30.83	12.39

3.-Realizar una regresión lineal.



A cada valor calculado en todas las cinéticas se le multiplica el factor de 1×10^9 para que la unidad final reportada sea $\mu\text{mol} / 1 \times 10^6 \text{ cel-h}$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B-5 Cálculo de la velocidad específica de consumo de glutamina durante la fase de producción

De la ecuación 4.7, es posible determinar el parámetro β como la pendiente de una gráfica de concentración de glutamina contra índice de viabilidad:

$$\underbrace{s_0 - s}_{y} = \underbrace{\beta}_{m} \cdot \underbrace{\int x_v \cdot dt}_{x}$$

donde,

s_0 = concentración de sustrato en el tiempo cero

s = concentración de sustrato en el tiempo t

$\beta = q_s$, velocidad específica de consumo de sustrato

$\int x dt$ = índice de viabilidad

Los cálculos se ilustran con datos de la misma cinética que la empleada en el **Apéndice B-**

2. El cálculo de β se realiza mediante el siguiente procedimiento:

1.-Calcular el delta de glutamina, considérese el valor inicial de glutamina (tiempo cero de la cinética)

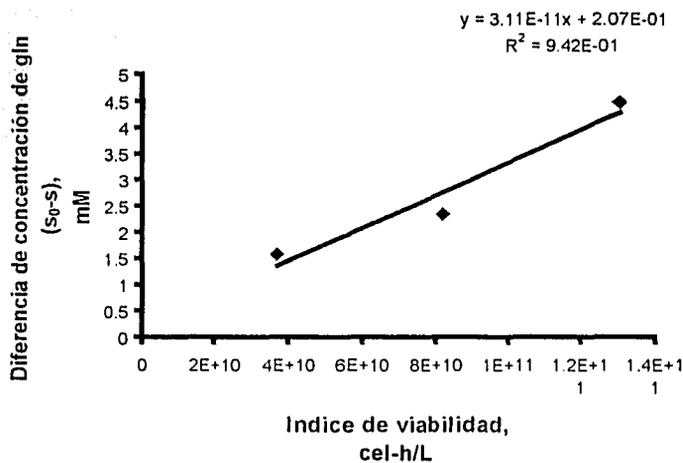
$$\Delta \ln = [\text{glutamina inicial}] - [\text{glutamina en el tiempo } t]$$

2.-Graficar sólo los puntos hasta donde se logra la máxima generación de células viables.

Nota: en algunos casos como los cultivos controlados a 3 y 12% OD, se eligieron máximo 3 puntos para disminuir el error en los cálculos realizados. En el eje x, índice de viabilidad y en el eje y, delta de glutamina.

Indice de viabilidad (cel-h/L)	[gln] (mM)	Delta [gln] (mM)
	10.605	
36960000000	9.03	1.58
82162500000	8.26	2.35
1.31E+11	6.13	4.48
1.73E+11	7.18	3.43
1.90E+11	5.85	4.76

3.-Realizar una regresión lineal.



A cada valor calculado en todas las cinéticas se le multiplica el factor de 1×10^9 para que la unidad final reportada sea $\mu\text{mol} / 1 \times 10^6 \text{ cel-h}$

B-6 Cálculo para rendimiento de generación de biomasa sobre consumo de sustrato

($Y_{xv/glc}$ ó $Y_{xv/gln}$)

Los cálculos se ilustran con datos de la misma cinética que la empleada en el **Apéndice B-**

2. Utilizando la ecuación 4.10, se sustituyen los valores que se encuentran sombreados en la tabla ilustrada en esta sección.

Ejemplo para ($Y_{xv/glc}$)

$$Y_{xv/glc} = \frac{(2.11 \times 10^9 - 1.33 \times 10^9)}{(43.22 - 34.83)} = 9.298 \times 10^7$$

Ejemplo para ($Y_{xv/gln}$)

$$Y_{xv/gln} = \frac{(2.11 \times 10^9 - 1.33 \times 10^9)}{(10.605 - 6.125)} = 1.74 \times 10^8$$

Tiempo (hpi)	x_v (cel/L)	[glc] mM	[gln] mM
0	1.33E+09	43.22	10.61
24	1.75E+09	40.56	9.03
48.5	1.94E+09	39.33	8.26
72.5	2.11E+09	34.83	6.13
96	1.45E+09	38.94	7.18
112	7.00E+08	30.83	5.85

las unidades de ($Y_{xv/glc}$ ó $Y_{xv/gln}$) están definidas como, cel / mmol glc ó gln, respectivamente.

A cada valor calculado en todas las cinéticas se le divide entre 1×10^9 para que la unidad final reportada sea, 1×10^6 cel generadas/ μ mol glc ó gln consumida.

B-7 Cálculo para rendimiento de producción de proteína recombinante sobre generación de biomasa ($Y_{p/xv}$)

Los cálculos se ilustran con datos de la misma cinética que la empleada en el **Apéndice B-2**. Utilizando la ecuación 4.11, se sustituyen los valores que se encuentran sombreados en la tabla ilustrada en esta sección.

Ejemplo:

$$Y_{p/xv} = \frac{(35.74 - 0)}{(2.11 \times 10^6 - 1.33 \times 10^6)} = 4.5810^{-5}$$

Tiempo	xv	[pr]
(hpi)	cel/mL	µg/mL
0	1.33E+06	0.00
24	1.75E+06	0.00
48.5	1.94E+06	24.74
72.5	2.11E+06	35.74
96	1.45E+06	19.07
112	7.00E+05	12.06

la unidad de ($Y_{p/xv}$) está definida como, µg / cel

A cada valor calculado en todas las cinéticas se le multiplica el factor de 1×10^6 para que la unidad final reportada sea , µg proteína recombinante producida / 1×10^6 cel generada

Apéndice C

Cinéticas completas de cultivos control individuales no mostrados en sección de resultados y discusión

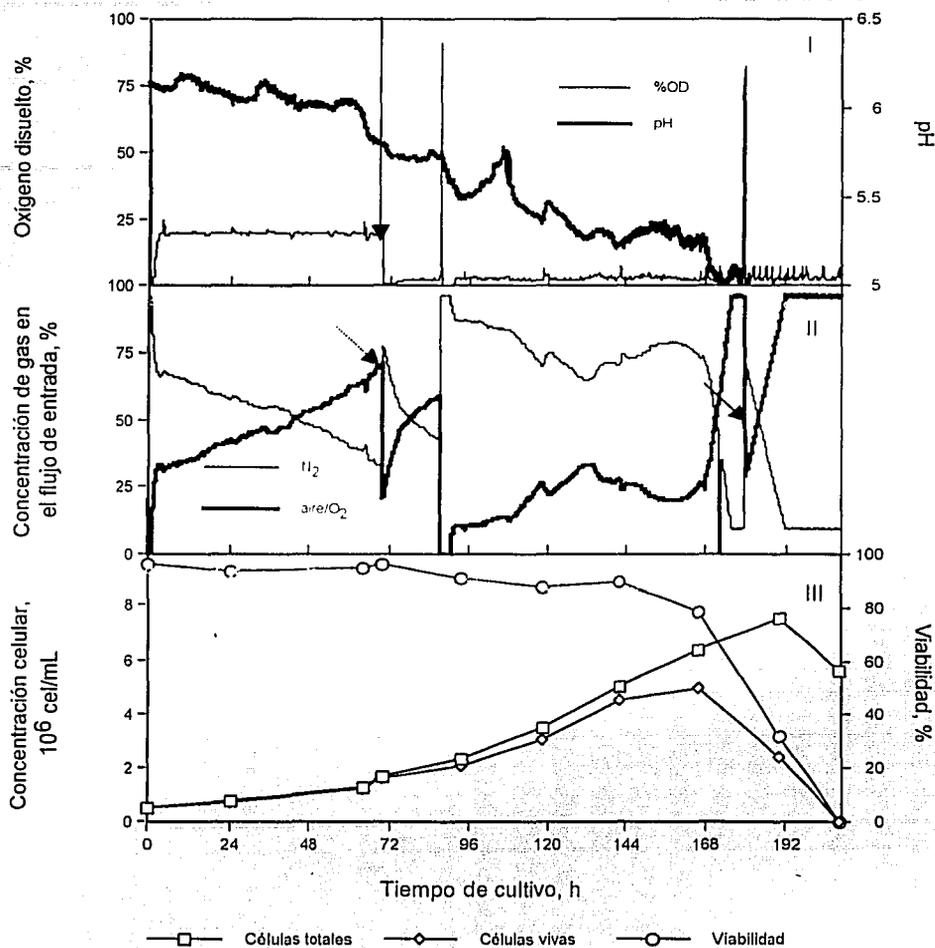


Figura C-1 Perfiles cinéticos de cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 3% de OD. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha inclinada punteada a las 88 h indica el cambio de gas aire a O₂, mientras que la no punteada a las 172 h indica el cambio de O₂ a aire. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

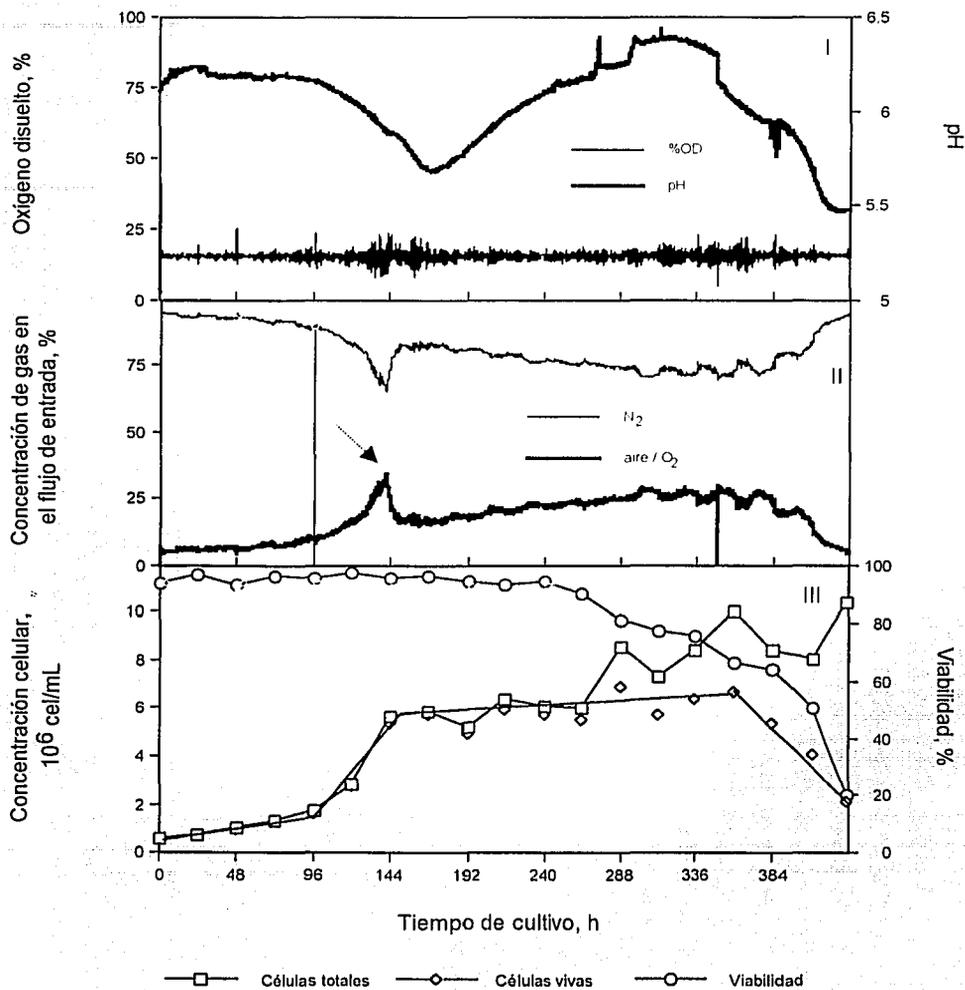


Figura C-2 Perfiles cinéticos de cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 20% de OD. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha inclinada y punteada a las 140 h indica el cambio de gas de entrada de aire a O_2 . Al panel III se dibujaron líneas para indicar la tendencia esperada del cultivo.

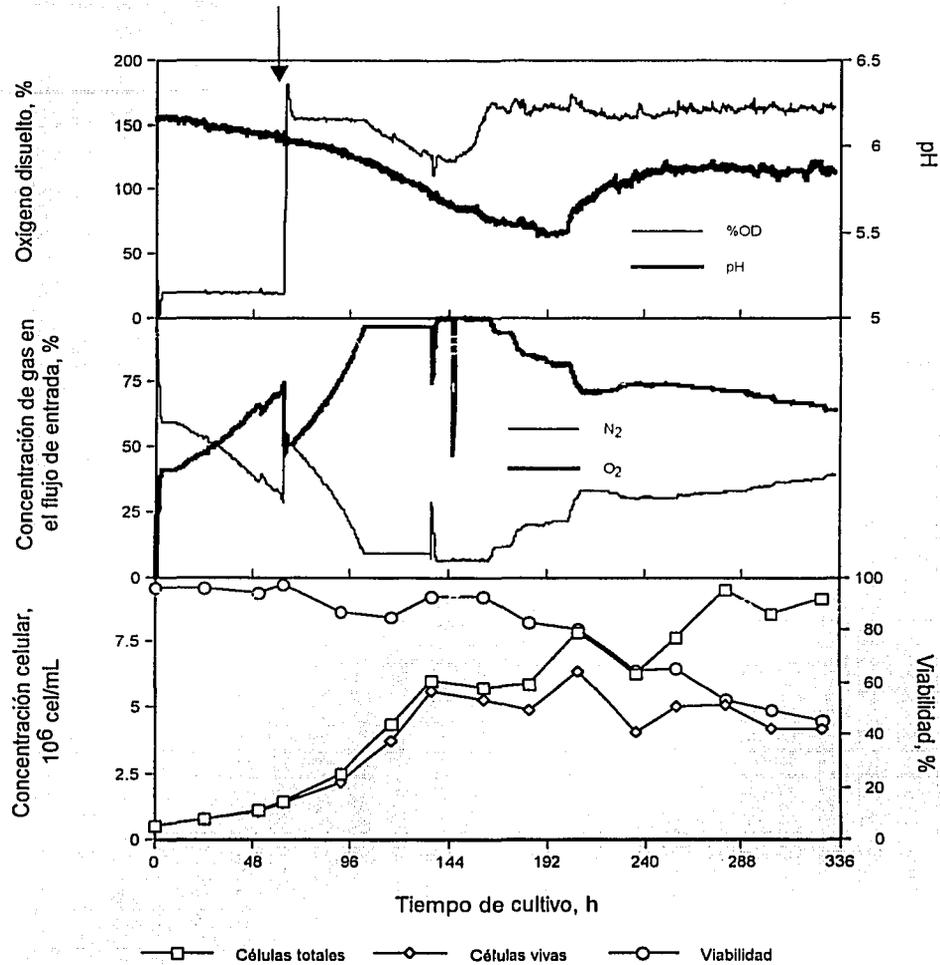


Figura C-3 Perfiles cinéticos de cultivo control (no infectado) de células de insecto en biorreactor mantenido a 160% de OD. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

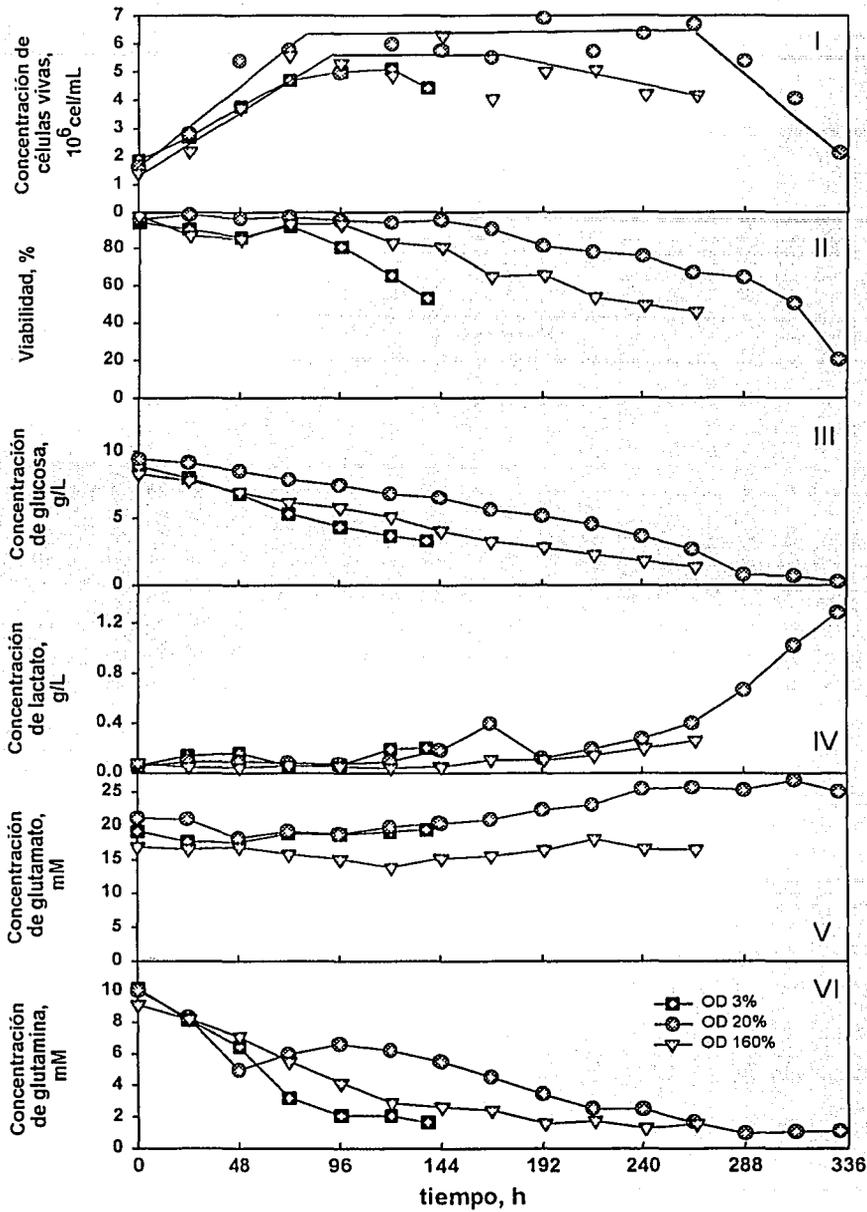


Figura C-4 Cinéticas típicas de las células Sf-9 en lotes no infectados (control) realizados en biorreactores. Sólo se muestran los datos después del cambio escalonado de OD. I. Concentración de células vivas, II. % viabilidad, III. Concentración de glucosa, IV. Concentración de lactato, V. Concentración de glutamato, VI. Concentración de glutamina.

TEMA CON
FALLA DE ORIGEN

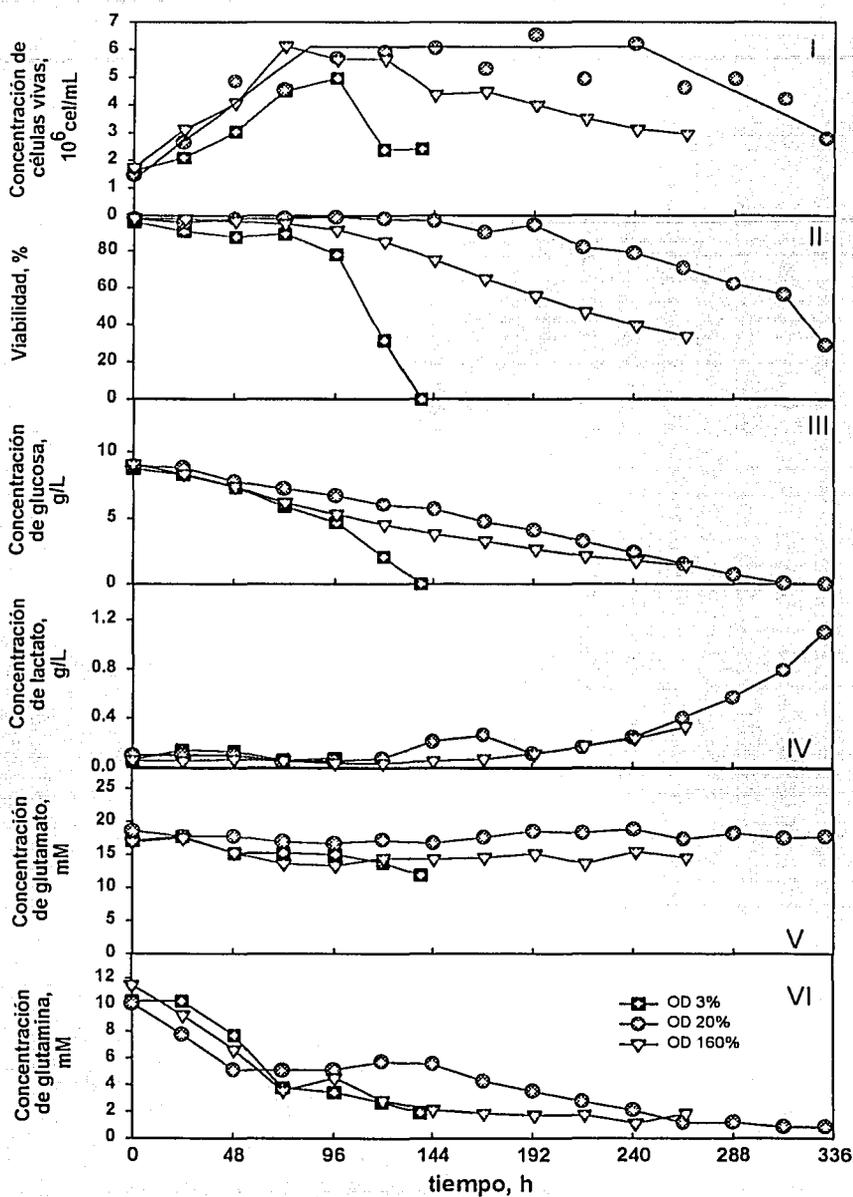


Figura C-5 Cinéticas típicas de las células Sf-9 en lotes no infectados (control) realizados e biorreactores. Sólo se muestran los datos después del cambio escalonado de OD. I. Concentración de células viables, II. % viabilidad, III. Concentración de glucosa, IV. Concentración de lactato, V. Concentración de glutamato, VI. Concentración de glutamina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Apéndice D

Valores de velocidad específica de crecimiento durante la fase previa a la infección (o antes del cambio escalonado de OD para cultivos control)

Oxígeno disuelto	Velocidad específica de crecimiento LOTE A	Velocidad específica de crecimiento LOTE B	Velocidad específica de crecimiento promedio
%	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)
"cultivos infectados"			
0	0.0181	0.0188	0.0185±0.0004
3	0.0114	0.0331	0.0223±0.0109
12	0.0127	0.0123	0.0125±0.0002
20	0.0185	0.0077	0.0131±0.0054
80	0.0171	0.013	0.0151±0.0021
160	0.0232	0.0156	0.0194±0.0038
"cultivos control"			
3	0.0161	0.0148	0.0154±0.0007
20	0.0119	-	0.0119±0.0000
160	0.011	0.0178	0.0144±0.0034

Tabla D-1 Valores de velocidad específica de crecimiento antes de infección (o antes del cambio escalonado de OD para el caso de los cultivos control) calculada para cada cinética infectada y sin infectar. El OD se controló a 20% para cada uno de los cultivos.

Apéndice E

Cultivos infectados

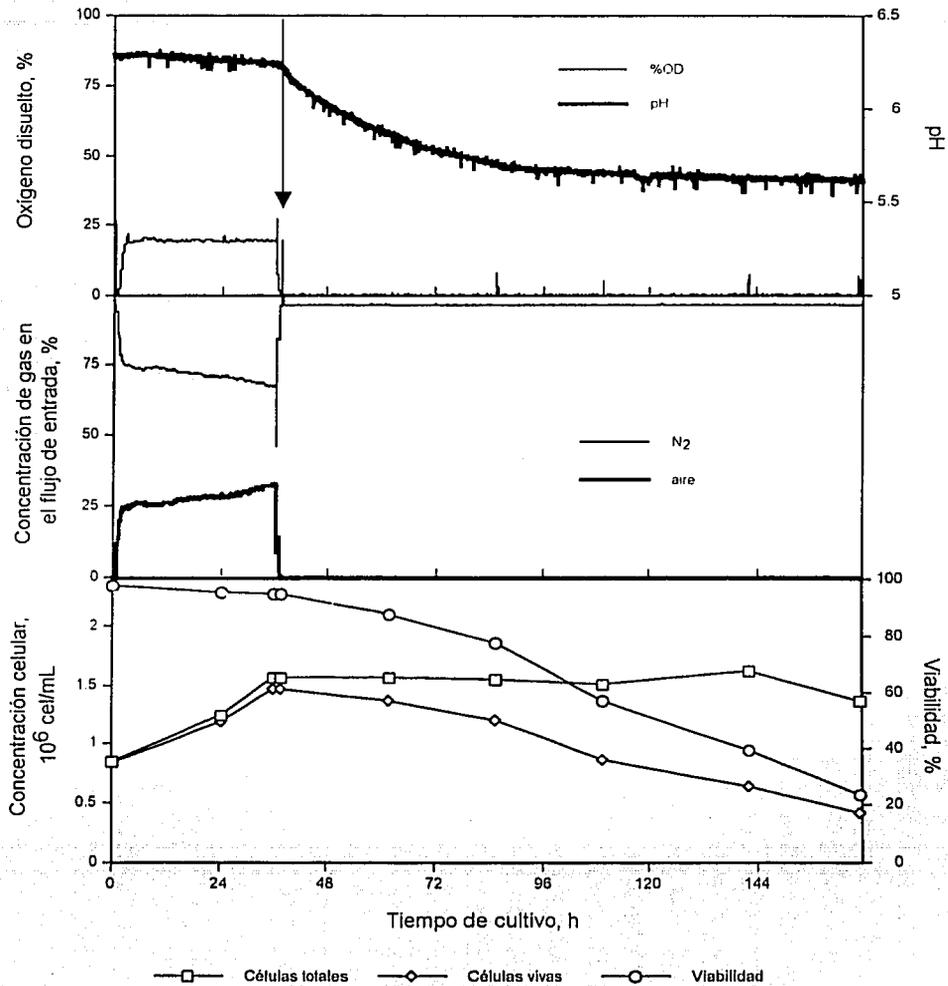


Figura E-1 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 0%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

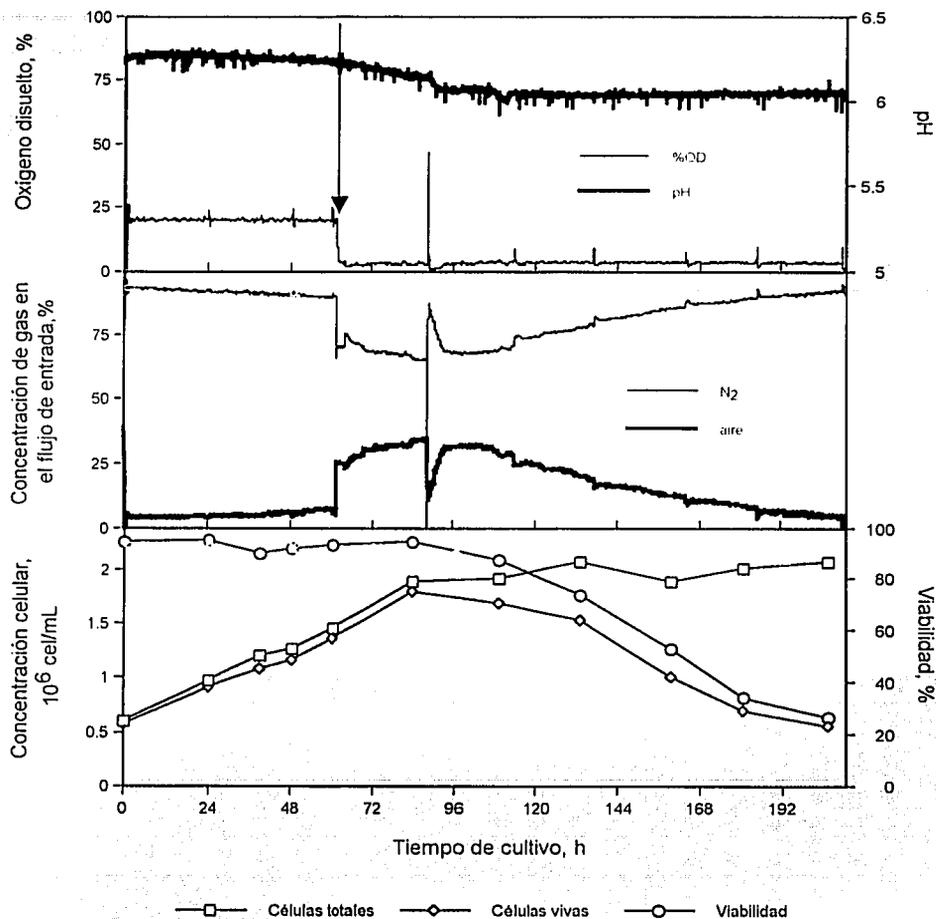


Figura E-2 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas en biorreactor y con control de OD a 3%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

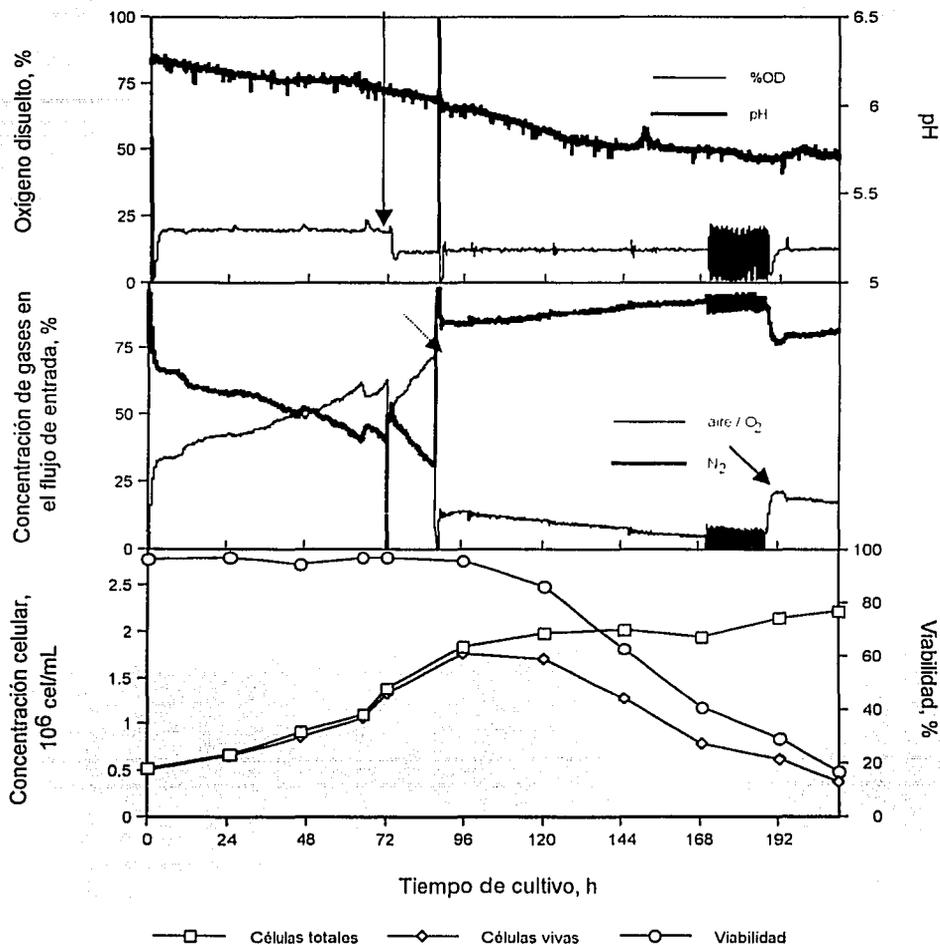


Figura E-3 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 12%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha inclinada punteada a las 72 h indica el cambio de gas aire a O₂, mientras que la no punteada a las 192 h indica el cambio de O₂ a aire. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

TESIS CON
FALLA DE CONTENIDO

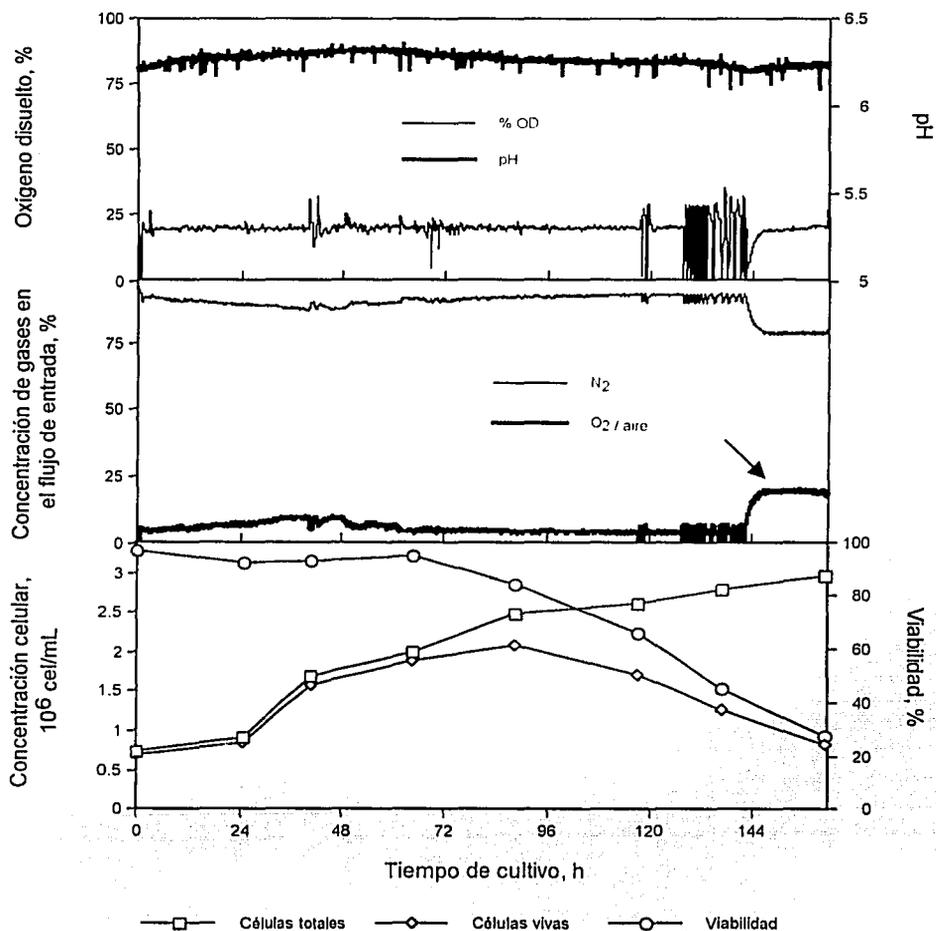


Figura E-4 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 20%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha inclinada a las 142 h indica el cambio de gas O₂ a aire. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

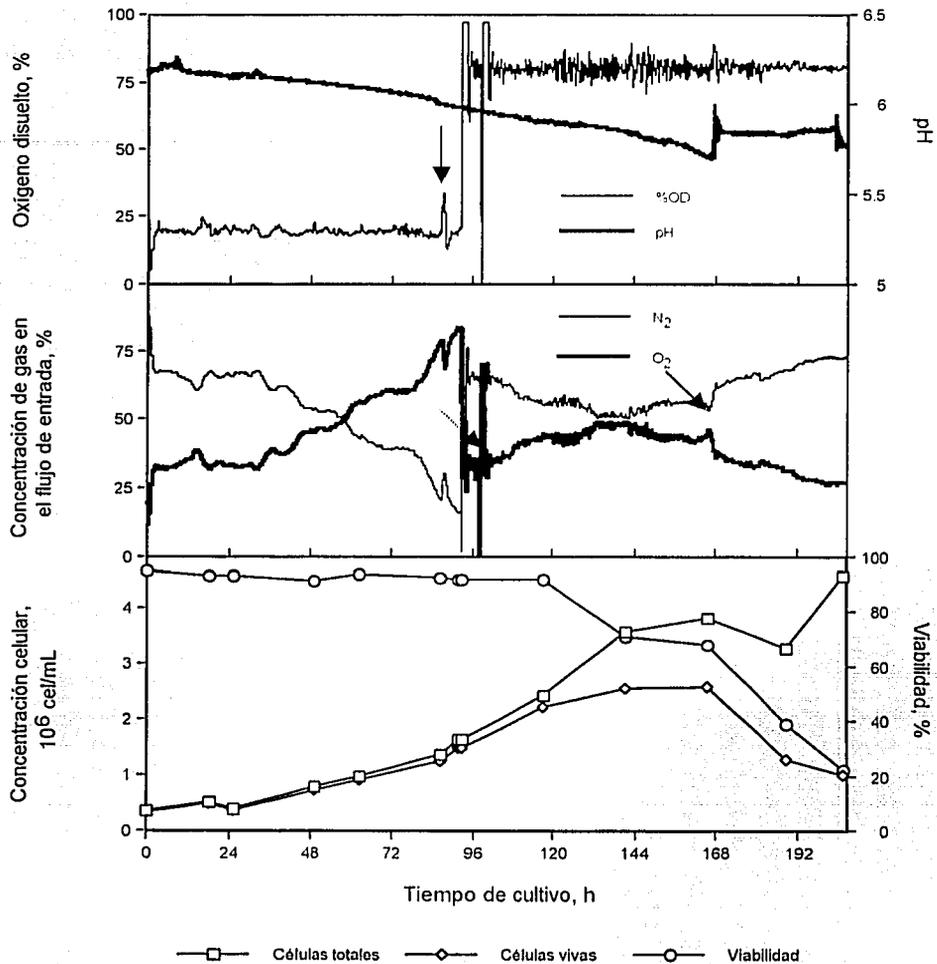


Figura E-5 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 80%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha inclinada puntada a las 92 h indica el cambio de gas aire a O_2 , mientras que la no puntada a las 168 h indica el cambio de O_2 a aire. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

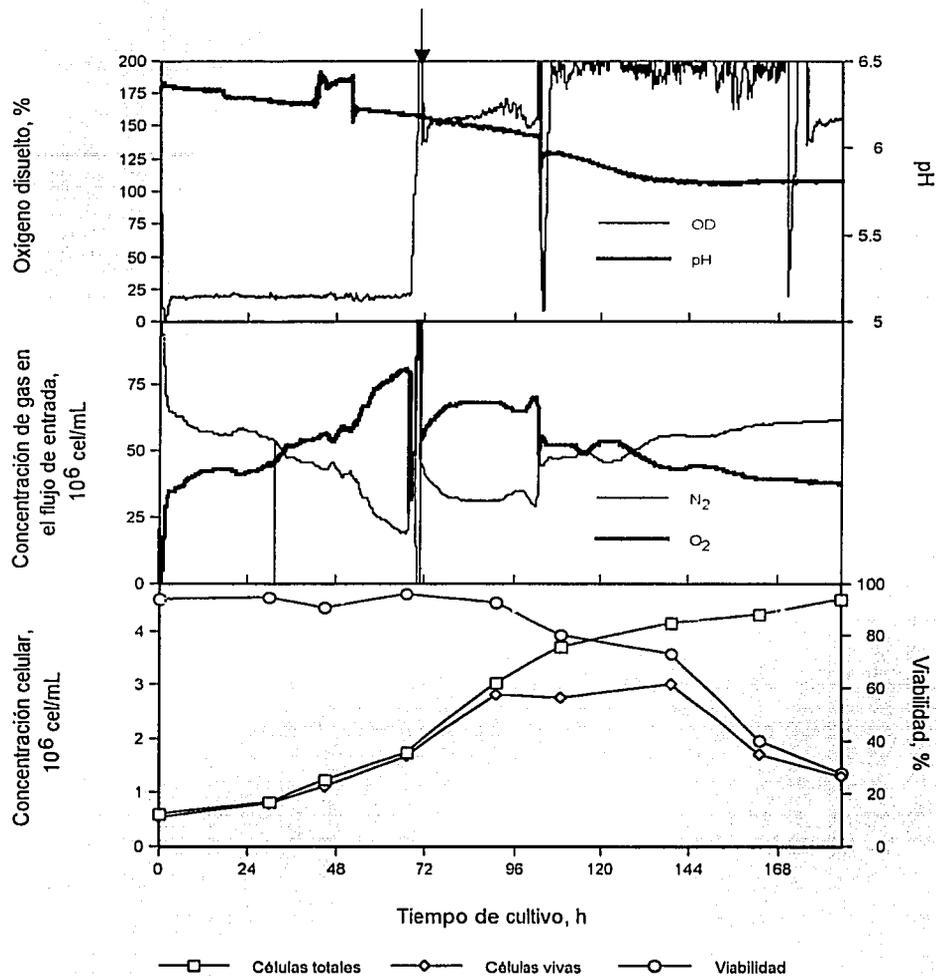


Figura E-6 Perfiles cinéticos de cultivo en biorreactor de células de insecto infectadas y con control de OD a 160%. I. Perfiles de OD y pH. II. Perfiles de gases. III. Perfiles de concentración de células totales, células viables y % viabilidad. La flecha vertical indica el cambio escalonado en OD.

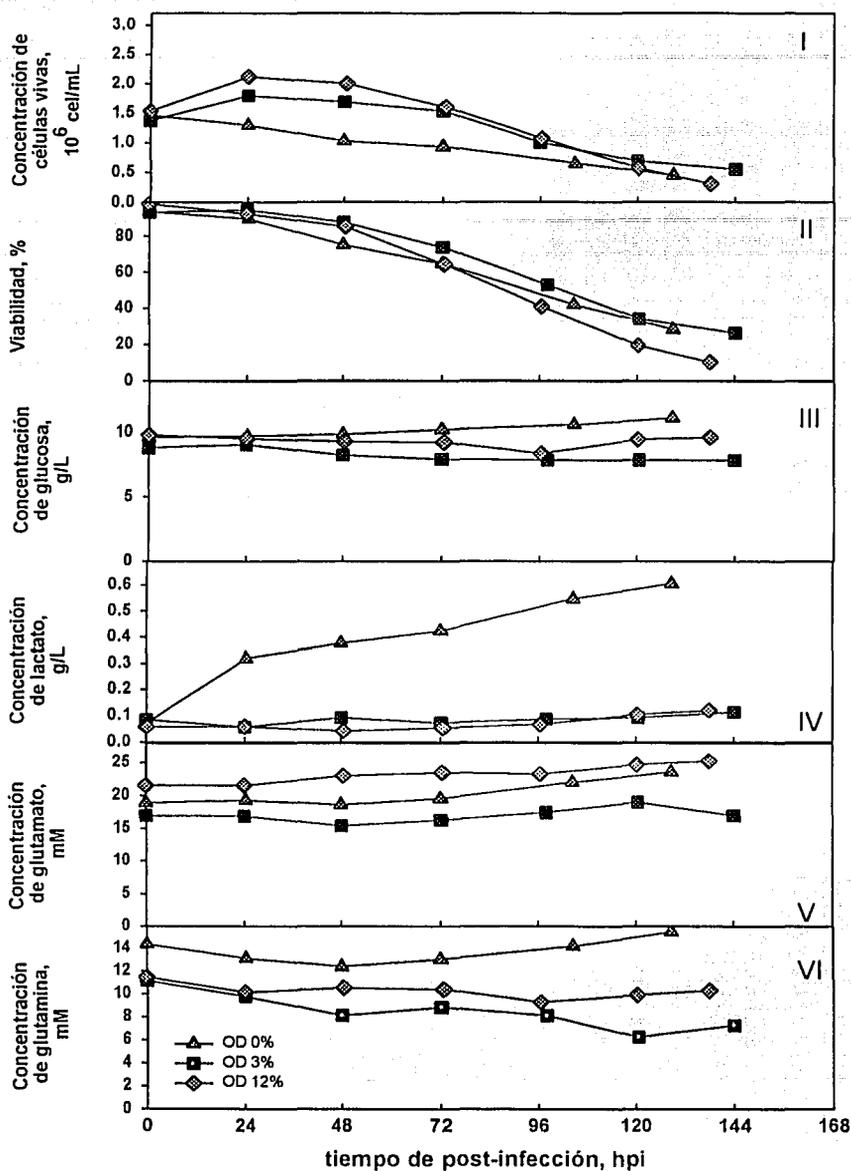


Figura E-7 Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores. I. Concentración de células vivas, II. % viabilidad, III. Concentración de glucosa, IV. Concentración de lactato, V. Concentración de glutamina. (lote A)

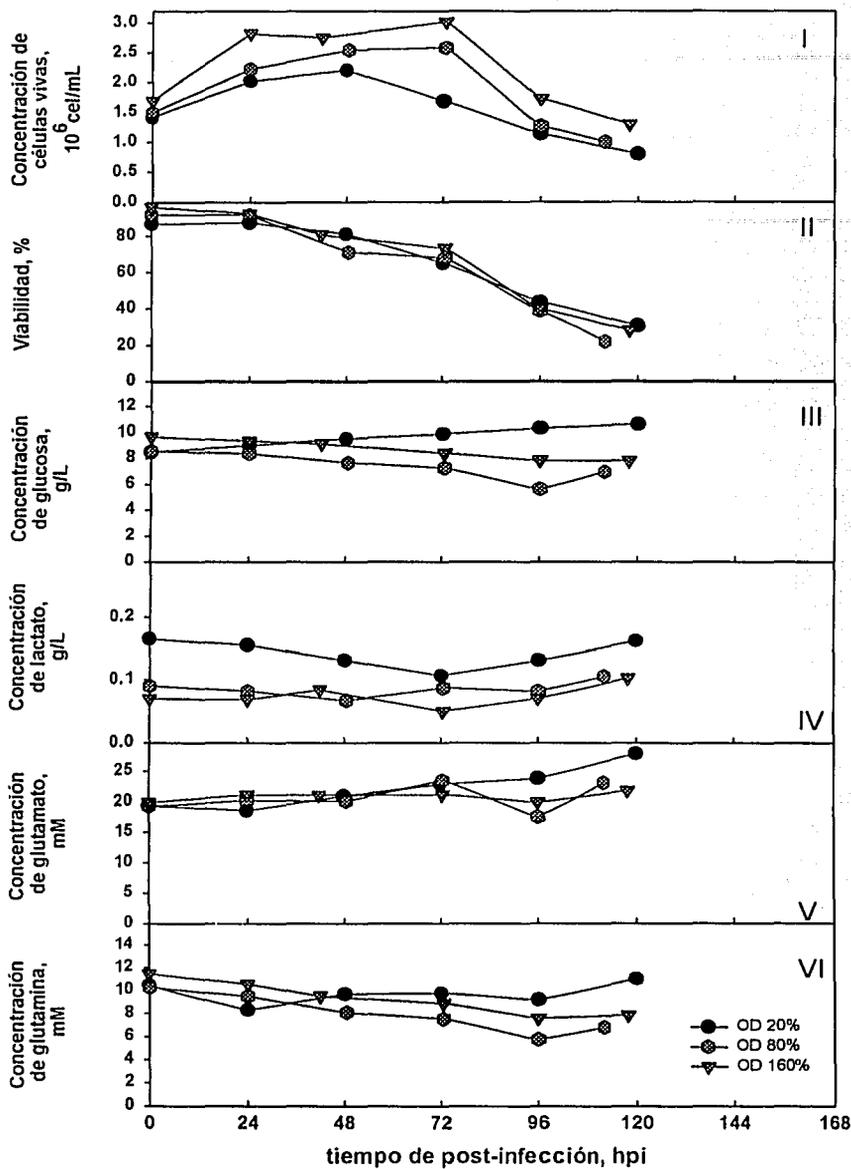
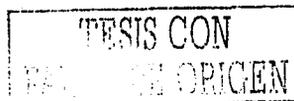


Figura E-8 Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores. I. Concentración de células viables, II. % viabilidad, III. Concentración de glucosa, IV. Concentración de lactato, V. Concentración de glutamina. (lote A)



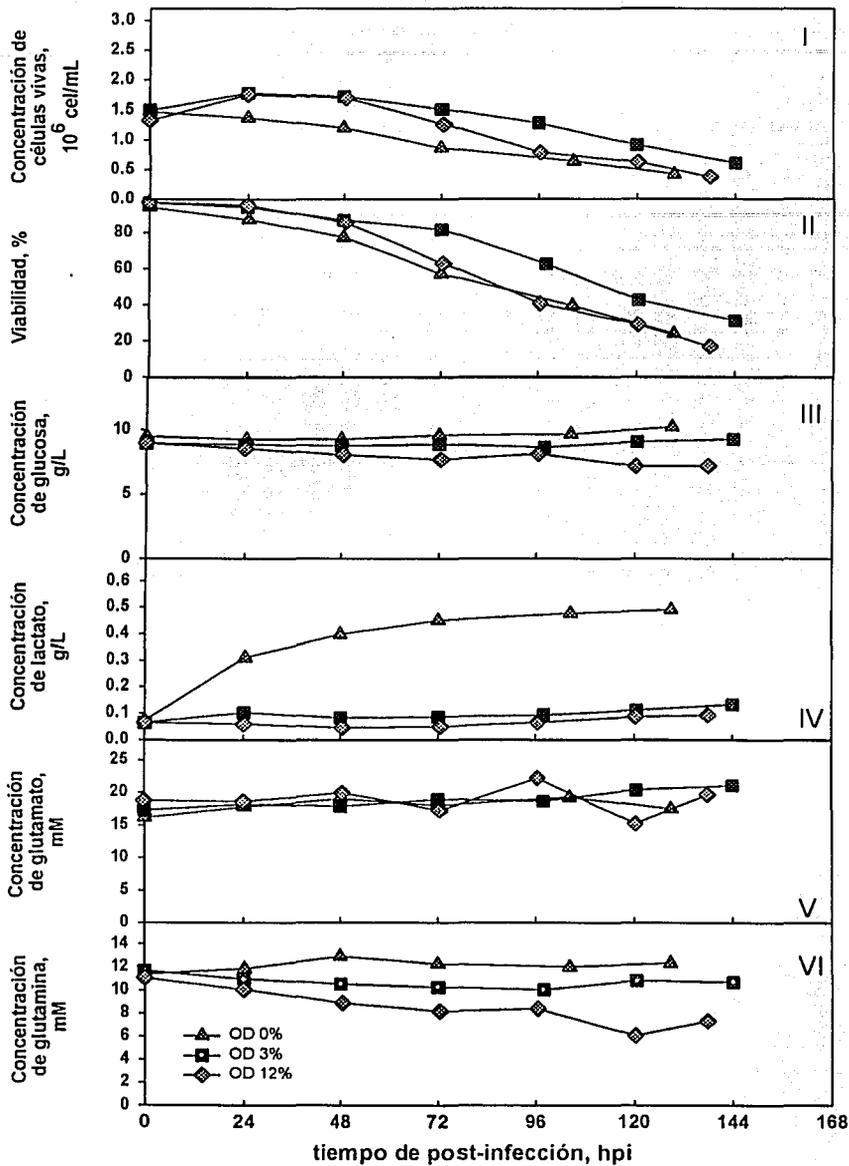
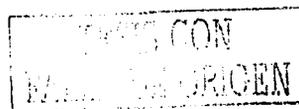


Figura E-9 Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores. I. Concentración de células vivas, II. % viabilidad, III. Concentración de glucosa, IV. Concentración de lactato, V. Concentración de glutamina. (lote B)



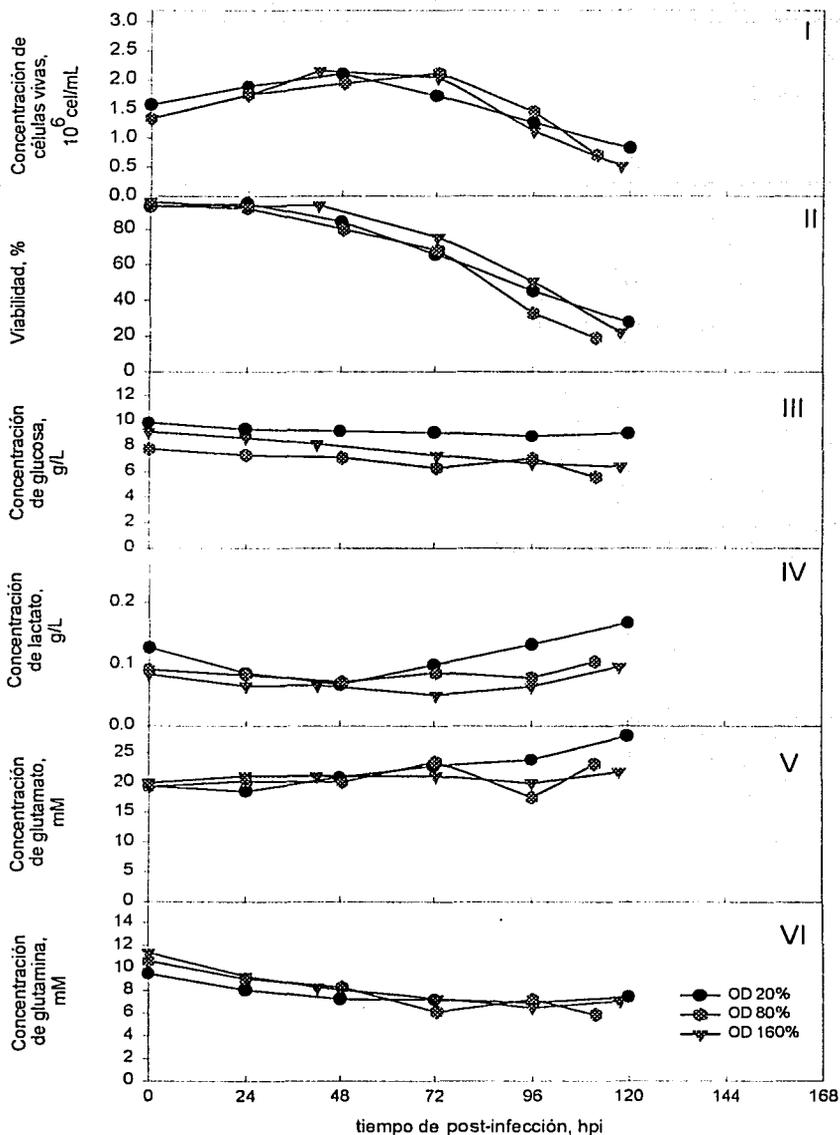


Figura E-10 Cinéticas típicas de células Sf-9 en lotes infectados realizados en biorreactores. I. Concentración de células vivas, II. % viabilidad, III. Concentración de glucosa, IV. Concentración de lactato, V. Concentración de glutamina. (lote B)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Apéndice F

Rendimientos

OD	$Y_{sv/glc}$ $1 \times 10^6 \text{ cel}/\mu\text{mol}$
0%	0
3%	0.029 ± 0.006
12%	0.116 ± 0.048
20%	0.142 ± 0.000
80%	0.120 ± 0.027
160%	0.198 ± 0.070
3% s/i	0.149 ± 0.008
20% s/i	0.206 ± 0.017
160% s/i	0.240 ± 0.033

OD	$Y_{sv/gln}$ $1 \times 10^6 \text{ cel}/\mu\text{mol}$
0%	0
3%	0.058 ± 0.051
12%	0.331 ± 0.016
20%	0.264 ± 0.027
80%	0.287 ± 0.113
160%	0.373 ± 0.045
3% s/i	0.522 ± 0.056
20% s/i	0.789 ± 0.013
160% s/i	0.655 ± 0.101

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla F-1 Rendimientos calculados para $Y_{sv/glc}$ y $Y_{sv/gln}$ en cultivos infectados y sin infectar. s/i se refiere a cultivos control sin infectar.

OD	$Y_{p/xvs}$ $\mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{ cel}$
0%	0
3%	21.532 ± 2.900
12%	20.000 ± 0.125
20%	29.732 ± 9.518
80%	45.212 ± 0.614
160%	15.272 ± 5.519

OD	$Y_{p/glc}$ g/mol
0%	0
3%	2.622 ± 0.110
12%	2.925 ± 1.730
20%	10.433 ± 0.000
80%	6.931 ± 0.758
160%	3.042 ± 1.514

OD	$Y_{p/gln}$ g/mol
0%	0
3%	2.886 ± 0.153
12%	3.540 ± 0.675
20%	16.004 ± 9.830
80%	18.547 ± 6.361
160%	5.707 ± 0.407

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla F-2 Rendimientos calculados para $Y_{p/xvs}$, $Y_{p/glc}$ y $Y_{p/gln}$ en cultivos infectados. s/i se refiere cultivos control sin infectar.