



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS**

**Evaluación de sistemas de doble  
compartimento para escalamiento  
descendente en cultivos de células  
animales: Simulación de gradientes de  
oxígeno disuelto e impacto de esfuerzos de  
corte subletales sobre la glicosilación de  
proteína recombinante**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**IBQ Argel Gastélum Arellánez**

**Directora de Tesis: Dra. Laura A. Palomares Aguilera**

**Cuernavaca, Mor., 2009**





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.

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 de la Dra. Laura A. Palomares Aguilera, en el grupo del Dr. Octavio T. Ramírez Reivich. Durante la realización del mismo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por medio del proyecto CONACyT-Salud 2007-c01-69911, así como de la beca CONACyT 169916. También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través del proyecto PAPIIT-UNAM IN-206407.

“Ignoro qué idea se habrá formado de mí el mundo; pero a mis propios ojos yo creo no haber sido más que un niño que juega en la playa, y que se divierte siempre que encuentra una piedra más lisa que otra, o una concha más bella que la anterior, mientras el inmenso océano de la verdad se extiende desconocido ante mí”.

*Isaac Newton.*

## **Dedicatorias**

### **A Montse.**

Gracias por tu amor y apoyo incondicionales,  
por animarme y ayudarme a no desistir en los momentos difíciles.  
Eres lo mejor que me ha pasado. Te amo.

**A mis padres, Brígida y Efraín;  
mis hermanas, Hada Celeste y Alondra Cirene;  
y mi sobrina, Dhamara Karyme.**

Quienes han sido mi guía desde la infancia.  
Los llevo siempre en mi corazón.

### **A mis suegros, Cecilia y Raymundo.**

Quienes me han aceptado en su familia como a un hijo.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Laura A. Palomares A., por su asesoría durante el desarrollo del proyecto, por su apoyo, paciencia y comprensión, muchas gracias.

Al Dr. Octavio T. Ramírez R., gracias por permitirme formar parte de su grupo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Laura A. Palomares A., Dr. Enrique Galindo Fentanes, Dr. Baltazar Becerril y Dr. Octavio T. Ramírez R., por su guía tan importante durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Laura A. Palomares A., Dra. Marcela Ayala Aceves, Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Dr. Carlos F. Peña Malacara y Dr. Iván Martínez Duncker, por sus valiosas observaciones y sugerencias a este manuscrito.

Al Dr. Leobardo Serrano y al personal de Planta Piloto, por permitirme utilizar las instalaciones de la planta para una parte importante del presente trabajo.

A la Lic. Karin Levy, por su amistad, compañerismo y su extraordinaria eficiencia y capacidad.

A Don Javier Dorantes López, por su camaradería y excelente apoyo técnico.

A Zoila Vanessa Hernández Rodríguez, gracias por su apoyo técnico.

A la Unidad de Cómputo, que siempre están pendientes de las necesidades de todo el IBT.

A Gloria Villa, por su atención siempre amable, sonriente, paciente y muy eficiente.

A todos mis compañeros de ambos grupos del laboratorio, que siempre estuvieron dispuestos a ayudar, platicar, celebrar y discutir de forma interesante, enriquecedora y amena.

A todos... ¡muchas gracias!

Este documento se elaboró utilizando programas libres y de código abierto.

- Sistema operativo: Ubuntu 8.04 LTS, Hardy Heron.  
<http://www.ubuntu.com/>
- Redacción de tesis, análisis de datos: OpenOffice.org 3.1.0 (paquetería ofimática).  
<http://www.openoffice.org/>
- Análisis de modelos matemáticos: Maxima 5.18.1 (sistema de cálculo simbólico y numérico).  
<http://maxima.sourceforge.net/>
- Diagramas: Inkscape 0.46 (editor de gráficos vectoriales).  
<http://www.inkscape.org/>

---

---

## CONTENIDO

|  |      |
|--|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS  | x    |
| ÍNDICE DE TABLAS   | xi   |
| NOMENCLATURA   | xiii |
| RESUMEN  | 1    |
| 1. INTRODUCCIÓN  | 4    |
| 2. ANTECEDENTES  | 6    |
| 2.1. Producción de proteínas recombinantes   | 6    |
| 2.2. Glicosilación de proteínas.   | 7    |
| 2.2.1. N-glicosilación.  | 8    |
| 2.2.2. N-glicosilación en células de insecto   | 9    |
| 2.3. Escalamiento  | 12   |
| 2.3.1. Escalamiento descendente  | 13   |
| 2.3.1.1. Análisis de régimen   | 13   |
| 2.3.1.2. Simulación  | 16   |
| 2.3.1.3. Optimización y Aplicación   | 19   |
| 2.4. Estrés hidrodinámico  | 19   |
| 2.4.1. Esfuerzos de corte y daños celulares letales  | 20   |
| 2.4.2. Teoría de Kolmogorov aplicada a tanques agitados: Microescala de torbellinos y esfuerzo de corte máximo | 21   |
| 2.4.2.1. Estrés hidrodinámico letal en tanques agitados  | 23   |
| 2.4.3. Otras causas de estrés hidrodinámico en biorreactores agitados  | 25   |
| 2.4.4. Daños subletales por estrés hidrodinámico   | 25   |
| 3. HIPÓTESIS   | 28   |
| 4. OBJETIVOS   | 28   |
| 4.1. Objetivo General  | 28   |

|   |    |
|---|----|
| 4.2. Objetivos Específicos  | 28 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS   | 29 |
| 5.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo                        | 29 |
| 5.2. Baculovirus  | 29 |
| 5.3. Cultivos en biorreactor  | 30 |
| 5.3.1. Evaluación de la resistencia celular a la recirculación        | 30 |
| 5.3.2. Simulador de doble compartimento STR/PFR                       | 31 |
| 5.3.3. Simulador de doble compartimento PFR/PFR                       | 33 |
| 5.4. Métodos Analíticos   | 34 |
| 5.4.1. Determinación de la viabilidad celular                         | 34 |
| 5.4.2. Determinación de la concentración celular total y viable       | 34 |
| 5.4.3. Análisis de metabolitos  | 35 |
| 5.4.4. Análisis de la proteína recombinante                           | 36 |
| 5.4.4.1. Cuantificación   | 36 |
| 5.4.4.2. Cosecha  | 37 |
| 5.4.4.3. Purificación   | 37 |
| 5.4.5. Análisis del patrón de glicosilación de SeAP                   | 38 |
| 5.4.5.1. Desglicosilación enzimática de SeAP                          | 38 |
| 5.4.5.2. Marcaje de oligosacáridos con 2-amino benzamida              | 38 |
| 5.4.5.3. Digestión enzimática de 2-AB glicanos con exoglicosidasas    | 39 |
| 5.4.5.4. Separación de glicanos por HPLC                              | 40 |
| 5.5. Consideraciones matemáticas                                      | 41 |
| 5.5.1. Determinación de parámetros cinéticos de cultivo               | 41 |
| 5.5.1.1. Velocidad específica de crecimiento                          | 41 |
| 5.5.1.2. Velocidad específica de producción de proteína recombinante  | 42 |
| 5.5.1.3. Velocidad específica de producción de lactato                | 43 |
| 5.5.1.4. Velocidad específica de consumo de glucosa                   | 44 |
| 5.5.2. Determinación de parámetros estequiométricos de cultivo        | 44 |
| 5.5.2.1. Rendimientos   | 44 |
| 5.5.3. Modelamiento del perfil de OD en el compartimento PFR          | 45 |
| 5.5.4. Modelamiento de los esfuerzos de corte en el compartimento PFR | 47 |

|   |    |
|---|----|
| 5.5.4.1. Perfil parabólico de velocidad   | 47 |
| 5.5.4.2. Perfil de esfuerzos de corte   | 49 |
| 5.5.4.3. Esfuerzo de corte máximo   | 49 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN   | 50 |
| 6.1. Evaluación del perfil de gradientes de OD y esfuerzos de corte en sistemas de doble compartimento                  | 50 |
| 6.1.1. Sistema de doble compartimento STR/STR   | 50 |
| 6.1.2. Sistema de doble compartimento STR/PFR   | 51 |
| 6.1.3. Sistema de doble compartimento PFR/PFR   | 56 |
| 6.1.4. Esfuerzos de corte   | 58 |
| 6.2. Cultivo de células animales en sistemas de doble compartimento   | 60 |
| 6.2.1. Tolerancia de células de insecto a la recirculación mediante bomba peristáltica                                  | 60 |
| 6.2.2. Evaluación de cultivos de células animales en el sistema STR/PFR, con OD constante                               | 67 |
| 6.2.3. Evaluación de cultivos de células animales en el sistema PFR/PFR, con OD constante                               | 68 |
| 6.2.4. Análisis de resultados en los sistemas de doble compartimento  | 70 |
| 6.3. Impacto de esfuerzos de corte subletales sobre el perfil de glicosilación de SeAP producida en un sistema de CI-BV | 71 |
| 7. CONCLUSIONES   | 77 |
| PERSPECTIVAS  | 79 |
| BIBLIOGRAFÍA  | 81 |

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 2.1. Ejemplos de N-glicanos  | 8  |
| Figura 2.2. Procesamiento de N-glicanos en células animales   | 10 |
| Figura 2.3. Oscilación sinusoidal en un sistema de un compartimento para simular gradientes de OD   | 16 |
| Figura 2.4. Diagrama de un sistema de doble compartimento STR/STR   | 18 |
| Figura 5.1. Diagrama del sistema STR-loop (biorreactor recirculado con bombeo peristáltico)   | 31 |
| Figura 5.2. Diagrama del sistema STR/PFR para simular gradientes de OD  | 32 |
| Figura 5.3. Diagrama del sistema PFR/PFR para simular gradientes de OD  | 33 |
| Figura 5.4. Formación de gradientes de OD en el compartimento PFR   | 46 |
| Figura 5.5. Esquema del perfil parabólico de velocidad de un flujo laminar en una tubería cilíndrica  | 48 |
| Figura 6.1. Perfiles de OD en el sistema STR/PFR, en medio acuoso con $t_c$ de 227.3, 392.2 y 625 s   | 53 |
| Figura 6.2. Perfil del gradiente de OD en un sistema de doble compartimento STR/PFR, estimado para diferentes flujos de recirculación mediante la solución numérica del balance de masa para el compartimento PFR [ecuación (5-28)] | 54 |
| Figura 6.3. Perfiles de OD en el sistema PFR/PFR, en medio acuoso con $t_c$ de 230.8, 300, 418.6 y 692.3 s  | 56 |
| Figura 6.4. Perfil del gradiente de OD en un sistema de doble compartimento PFR/PFR, estimado para diferentes flujos de recirculación mediante la solución numérica del balance de masa para el compartimento PFR [ecuación (5-28)] | 57 |
| Figura 6.5. Cinéticas de crecimiento de CI Tn-4h en el biorreactor recirculado de la Figura 5.1   | 62 |
| Figura 6.6. Cultivos en el sistema STR/PFR  | 68 |
| Figura 6.7. Cultivos en el sistema PFR/PFR  | 69 |

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabla 2.1. | Algunos perfiles de glicosilación observados en CI (tomado de Palomares y Ramírez, 2002)  | 11 |
| Tabla 2.2. | Algunos reportes sobre esfuerzos de corte que producen lisis, en diferentes líneas celulares (adaptado de Garcia-Briones y Chalmers, 1994)                    | 21 |
| Tabla 2.3. | Estimación de la microescala de Kolmogorov y el esfuerzo de corte máximo, en algunas condiciones de cultivo reportadas para CA                                | 23 |
| Tabla 2.4. | Efectos subletales observados en células animales, sometidas a esfuerzos de corte bien definidos en flujo laminar (tomado de Ma et al., 2002)                 | 26 |
| Tabla 5.1. | Líneas celulares y condiciones de cultivo utilizadas para evaluar los simuladores de doble compartimento descritos en las secciones 5.3.2 y 5.3.3             | 29 |
| Tabla 6.1. | Gradientes de OD posibles en condiciones de cultivo típicas de CA   | 52 |
| Tabla 6.2. | Razones de $V_{bm}/V_{mm}$ , estimadas a partir del tiempo de exposición a condiciones limitantes de OD, en el simulador STR/PFR de la Figura 5.2             | 55 |
| Tabla 6.3. | Razones de $V_{bm}/V_{mm}$ , estimadas a partir del tiempo de exposición a condiciones limitantes de OD, en el simulador PFR/PFR de la Figura 5.3             | 58 |
| Tabla 6.4. | Esfuerzos de corte y gradientes de deformación estimados para los compartimentos PFR de los sistemas evaluados en este trabajo                                | 59 |
| Tabla 6.5. | Esfuerzos de corte, gradientes de deformación y microescala de Kolmogorov, estimados para los compartimentos STR de los simuladores evaluados en este trabajo | 60 |
| Tabla 6.6. | Parámetros de los cultivos de CI Tn-eh en el biorreactor recirculado de la Figura 5.1   | 63 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabla 6.7.  | Consumo de glucosa en cultivos de células Tn-4h con y sin recirculación mediante bombeo peristáltico  | 65 |
| Tabla 6.8.  | Producción de lactato en cultivos de células Tn-4h con y sin recirculación mediante bombeo peristáltico   | 65 |
| Tabla 6.9.  | Producción de SeAP en cultivos de células Tn-4h con y sin recirculación mediante bombeo peristáltico  | 65 |
| Tabla 6.10. | Estructuras propuestas y proporción relativa (por HPLC) para N-glicanos de SeAP, producida por células Tn-4h expuestas a diferentes condiciones de estrés hidrodinámico | 73 |
| Tabla 6.11. | Distribución relativa por tipo de estructura para N-glicanos de SeAP, producida por células Tn-4h en medio TNMFH, bajo diferentes condiciones de estrés hidrodinámico   | 74 |

## NOMENCLATURA

| Símbolo            | Descripción   | Unidades                      |
|--------------------|---|-------------------------------|
| -dS/dt             | Velocidad volumétrica de consumo de sustrato  | $\mu\text{mol}_s/\text{mL h}$ |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grado Celsius   | -                             |
| A                  | Área lateral del cilindro de radio = r  | $\text{cm}^2$                 |
| a                  | Área interfacial del segmento diferencial   | $\text{cm}^{-1}$              |
| A                  | Área de transferencia de oxígeno a través de la pared del tubo  | $\text{cm}^2$                 |
| A                  | Absorbancia   | nm                            |
| A7S                | Línea celular obtenida de <i>Pseudaletia unipuncta</i>  | -                             |
| ARN                | Ácido Ribonucleico  | -                             |
| BHK                | Células de Riñón de Hámster Bebé (“ <i>Baby Hamster Kidney cells</i> ”)   | -                             |
| C                  | Concentración de oxígeno disuelto   | $\text{mg}/\text{mL}$         |
| C                  | Concentración de gas disuelto   | $\text{mmol}/\text{L}$        |
| <i>c-fos</i>       | Activador transcripcional   | -                             |
| CA                 | Célula(s) Animal(es)  | -                             |
| CHO                | Células de Ovario de Hámster Chino (“ <i>Chinese Hamster Ovary Cells</i> ”)   | -                             |
| CI                 | Célula(s) de Insecto  | -                             |
| CI-BV              | Sistema Célula de Insecto - Baculovirus   | -                             |
| $C_{L(A)}$         | Concentración de oxígeno disuelto en el compartimento A del sistema STR/STR   | $\text{mmol O}_2/\text{L}$    |
| $C_{L(A)}^*$       | Concentración de oxígeno disuelto a la saturación, en el compartimento A del sistema STR/STR, de acuerdo a la temperatura del medio y la proporción de $\text{O}_2$ en el gas de entrada al reactor | $\text{mmol O}_2/\text{L}$    |
| $C_{L(B)}$         | Concentración de oxígeno disuelto en el compartimento B del sistema STR/STR   | $\text{mmol O}_2/\text{L}$    |
| $C_{L(B)}^*$       | Concentración de oxígeno disuelto a la saturación, en el compartimento B del sistema STR/STR, de acuerdo a la temperatura del medio y la proporción de $\text{O}_2$ en el gas de entrada al reactor | $\text{mmol O}_2/\text{L}$    |

| <b>Símbolo</b> | <b>Descripción</b>   | <b>Unidades</b>                        |
|----------------|--|--|
| $C_{L(ext)}$   | Concentración de oxígeno disuelto en el ambiente externo del tubo                          | mg/cm <sup>3</sup>                     |
| $C_{L(int)}$   | Concentración de oxígeno disuelto en el cultivo fluyendo en el interior del tubo           | mg/cm <sup>3</sup>                     |
| $C_{líquido}$  | Concentración molar del líquido  | mmol/L                                 |
| D              | Diámetro del impulsor  | m                                      |
| Da             | Dalton   | -                                      |
| $d_i$          | Diámetro interno de la tubería   | cm                                     |
| $dM/dt$        | Velocidad volumétrica de producción de metabolito  | $\mu\text{mol}_M/\text{mL h}$          |
| $dP/dt$        | Velocidad volumétrica de producción de proteína recombinante                               | $\mu\text{g}_{PR}/\text{mL h}$         |
| DpN1           | Línea celular obtenida de <i>Danaus plexippus</i>  | -                                      |
| F              | Fuerza   | kg cm/s <sup>2</sup>                   |
| F              | Flujo de recirculación en el sistema STR/STR   | L/h                                    |
| F              | Fucosa   | -                                      |
| $F_d$          | Factor de dilución   | -                                      |
| g              | Gramo  | g                                      |
| G              | Galactosa  | -                                      |
| Glc            | Glucosa  | -                                      |
| h              | Hora   | h                                      |
| H              | Constante de Henry   | atm                                    |
| HARV           | Biorreactor de microgravedad simulada  | -                                      |
| HB-24          | Línea celular de hibridomas  | -                                      |
| HB-32          | Línea celular de hibridomas  | -                                      |
| HeLa S3        | Línea celular de mamífero  | -                                      |
| HPLC           | Cromatografía líquida de alta resolución “ <i>High performance liquid chromatography</i> ” | -                                      |
| IGEPAL630      | tert-Octilfenoxo poli(oxietil)etanol   | -                                      |
| IgG            | Inmuno-globulina G   | -                                      |
| $I_v$          | Índice de viabilidad, $\int_0^t X_v dt$  | células h/mL                           |
| J              | Joule  | N m, kg m <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> |
| $k_L$          | Coficiente de transferencia de oxígeno   | cm/s                                   |

| <b>Símbolo</b> | <b>Descripción</b>   | <b>Unidades</b>                                       |
|----------------|--|---|
| $k_{La}$       | Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno   | $s^{-1}, h^{-1}$                                      |
| $k_{La(A)}$    | Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en el compartimento A del sistema STR/STR | $s^{-1}, h^{-1}$                                      |
| $k_{La(B)}$    | Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en el compartimento B del sistema STR/STR | $s^{-1}, h^{-1}$                                      |
| $K_{O_2}$      | Constante de saturación de oxígeno en el modelo de Monod                                       | %   |
| L              | Longitud de una tubería cilíndrica   | cm  |
| L              | Litro(s)   | L   |
| L929           | Línea celular de mamífero  | -   |
| Lac            | Lactato  | -   |
| M              | Metabolito   | -   |
| M              | Concentración del metabolito producido   | $\mu\text{mol}_M/\text{mL}$                           |
| M              | Concentración molar  | mol/L   |
| m              | Metro  | -   |
| M              | Manosa   | -   |
| MBO503         | Línea celular obtenida de <i>Mamestra brassicae</i>  | -   |
| MCF7           | Línea celular de cáncer mamario  | -   |
| MDI            | Multiplicidad de infección   | ufp/célula  |
| min            | Minuto   | min   |
| N              | Newton   | $\text{kg m}/s^2$                                     |
| N              | Velocidad de agitación   | rpm, $s^{-1}$   |
| N              | N-acetil glucosamina   | -   |
| $N_2$          | Nitrógeno gaseoso en la entrada del biorreactor  | -   |
| $N_P$          | Número de Potencia   | adimensional  |
| $O_2$          | Oxígeno gaseoso en la entrada del biorreactor  | -   |
| OD             | Oxígeno Disuelto   | % respecto a la saturación con aire                   |
| P              | Presión  | $\text{N}/\text{m}^2, (\text{kg cm}/s^2)/\text{cm}^2$ |
| P              | Concentración de proteína recombinante   | $\mu\text{g}_{PR}/\text{mL}$                          |
| P              | Número de partículas registradas por el Contador de Partículas (“ <i>Coulter Multisizer</i> ”) | células   |

| <b>Símbolo</b>             | <b>Descripción</b>  | <b>Unidades</b>   |
|----------------------------|---|---|
| P                          | Consumo de potencia   | W, kg m <sup>2</sup> /s <sup>3</sup>  |
| PF-68                      | Pluronic F-68   | -   |
| PFR                        | Biorreactor de flujo tapón (“ <i>Plug Flow Reactor</i> ”)   | -   |
| PFR/PFR                    | Sistema de doble compartimento, con dos biorreactores de flujo tapón interconectados                                | -   |
| p <sub>gas</sub>           | Presión parcial del gas   | atm   |
| P <sub>i</sub>             | Fosfato inorgánico  | -   |
| PNP                        | p-nitro fenol   | -   |
| PNPP                       | p-nitro fenil fosfato   | -   |
| p <sub>oxígeno</sub>       | Presión parcial de oxígeno  | atm   |
| PR                         | Proteína(s) Recombinante(s)   | -   |
| Q                          | Flujo volumétrico en una tubería cilíndrica   | mL/s  |
| q <sub>Glc</sub>           | Velocidad específica de consumo de glucosa  | μmol <sub>Glc</sub> /célula h,<br>μg <sub>Glc</sub> / 1x10 <sup>6</sup> células h |
| q <sub>Lac</sub>           | Velocidad específica de producción de lactato   | μmol <sub>Lac</sub> /célula h,<br>μg <sub>Lac</sub> / 1x10 <sup>6</sup> células h |
| q <sub>O<sub>2</sub></sub> | Velocidad específica de consumo de oxígeno  | mg/célula s,<br>mmol/célula h   |
| q <sub>SeAP</sub>          | Velocidad específica de producción de fosfatasa alcalina humana recombinante  | μg/célula h,<br>μg <sub>SeAP</sub> / 1x10 <sup>6</sup> células h                  |
| r                          | Radio interior variable en una tubería cilíndrica   | cm  |
| R                          | Radio interior total en una tubería cilíndrica  | cm  |
| r-tPA                      | Proteína recombinante activadora de plasminógeno (“ <i>Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Protein</i> ”) | -   |
| Re                         | Número de Reynolds  | Adimensional  |
| rhNGF                      | Factor de crecimiento del nervio humano   | -   |
| rpm                        | Revoluciones por minuto   | revoluciones/min  |
| S                          | Concentración del sustrato consumido  | μmol <sub>s</sub> /mL   |
| s                          | Segundo   | -   |
| S                          | Ácido siálico   | -   |
| SDS                        | Dodecil sulfato de sodio (“ <i>Sodium Dodecil Sulfate</i> ”)  | -   |
| SeAP                       | Fosfatasa alcalina humana truncada recombinante (“ <i>Secreted alkaline phosphatase</i> ”)                          | -   |

| <b>Símbolo</b>   | <b>Descripción</b>   | <b>Unidades</b>    |
|------------------|--|--------------------|
| Sf21             | Línea celular obtenida de <i>Spodoptera frugiperda</i>   | -                  |
| Sf9              | Línea celular obtenida de <i>Spodoptera frugiperda</i>   | -                  |
| SFB              | Suero Fetal Bovino   | -                  |
| STR              | Biorreactor de tanque agitado (“ <i>Stirred Tank Reactor</i> ”)  | -                  |
| STR/PFR          | Sistema de doble compartimento, con un tanque agitado interconectado con un biorreactor de flujo tapón | -                  |
| STR/STR          | Sistema de doble compartimento, con dos tanques agitados interconectados                               | -                  |
| t                | Tiempo   | h                  |
| TB/C3            | Línea celular de hibridomas  | -                  |
| t <sub>c</sub>   | Tiempo de circulación  | s                  |
| t <sub>CE</sub>  | Tiempo de crecimiento exponencial  | h                  |
| TDI              | Tiempo de infección  | células viables/mL |
| t <sub>M</sub>   | Tiempo de mezclado   | s                  |
| Tn-4h            | Línea celular obtenida de <i>Trichoplusia ni</i>   | -                  |
| Tn5B1-4          | Línea celular obtenida de <i>Trichoplusia ni</i>   | -                  |
| t <sub>R</sub>   | Tiempo de residencia   | s                  |
| t <sub>rxn</sub> | Tiempo de reacción   | s                  |
| t <sub>tm</sub>  | Tiempo de transferencia de masa  | s                  |
| ufp              | Unidad Formadora de Placa  | -                  |
| UG               | Unidades de Glucosa  | -                  |
| UI               | Unidad Internacional   | μmol/min           |
| v                | Velocidad lineal de flujo en una tubería cilíndrica  | cm/s               |
| V                | Volumen de muestra succionado por el Contador de Partículas (“ <i>Coulter Multisizer</i> ”)            | mL                 |
| V                | Viabilidad   | %                  |
| V <sub>(A)</sub> | Volumen de cultivo en el compartimento A del sistema STR/STR   | L                  |
| V <sub>(B)</sub> | Volumen de cultivo en el compartimento B del sistema STR/STR   | L                  |

| <b>Símbolo</b>   | <b>Descripción</b>   | <b>Unidades</b>   |
|------------------|--|---|
| $V_{bm}/V_{mm}$  | Relación de volumen bien mezclado a volumen mal mezclado, en biorreactores agitados tipo STR | -   |
| VCO              | Velocidad volumétrica de consumo de oxígeno  | mmol/L h  |
| $v_K$            | Velocidad de la microescala de Kolmogorov, velocidad de los microtorbellinos                 | m/s   |
| $V_s$            | Volumen del segmento diferencial   | cm <sup>3</sup>   |
| $V_T$            | Volumen total  | mL  |
| VTO              | Velocidad de transferencia de oxígeno  | mmol/L h  |
| vvm              | Volumen de gas por volumen de líquido por minuto   | $L_{gas}/L_{liquido} \text{ min,}$<br>l/min                               |
| W                | Watt   | J/s, kg m <sup>2</sup> /s <sup>3</sup>                                    |
| $X_T$            | Concentración celular total en la muestra  | células/mL  |
| $X_V$            | Concentración celular viable en la muestra   | células/mL  |
| Xv               | Concentración celular viable   | células/mL  |
| $X_{V_0}$        | Concentración de células viables en el tiempo 0  | células/mL  |
| $X_{V_{máx}}$    | Concentración celular viable máxima  | células/mL  |
| $Y_{Lac / Glc}$  | Rendimiento Lactato/Glucosa  | $\text{mol}_{Lac}/\text{mol}_{Glc},$<br>$\text{g}_{Lac} / \text{g}_{Glc}$ |
| $Y_{SeAP / Lac}$ | Rendimiento SeAP/Lactato   | $\text{g}_{SeAP} / \text{g}_{Lac}$  |
| $Y_{SeAP / Glc}$ | Rendimiento SeAP/Glucosa   | $\text{g}_{SeAP}/\text{mol}_{Glc},$<br>$\text{g}_{SeAP} / \text{g}_{Glc}$ |
| $Y_{Xv / Glc}$   | Rendimiento Biomasa/Glucosa  | células/ $\mu\text{mol}_{Glc},$<br>células/mg <sub>Glc</sub>              |
| z                | Longitud axial   | cm  |
| $\alpha$         | Constante estequiométrica de Leudeking-Piret   | $\mu\text{g}_{PR}/\text{célula}$  |
| $\beta$          | Constante cinética de Leudeking-Piret  | $\mu\text{g}_{PR}/\text{célula h}$  |
| $\gamma$         | Gradiente de deformación o de velocidad (dv/dr)  | s <sup>-1</sup>   |
| $\varepsilon$    | Energía de disipación promedio en biorreactores agitados por unidad de masa                  | m <sup>2</sup> /s <sup>3</sup> , W/kg                                     |
| $\varepsilon'$   | Energía de disipación local, zona cercana al impulsor  | m <sup>2</sup> /s <sup>3</sup> , W/kg                                     |
| $\eta$           | Viscosidad dinámica  | N s/m <sup>2</sup>  |

| <b>Símbolo</b>        | <b>Descripción</b>   | <b>Unidades</b>    |
|-----------------------|--|--------------------|
| $\lambda'_K$          | Tamaño de la microescala de Kolmogorov, longitud de los microtorbellinos, en la zona cercana al impulsor | m                  |
| $\lambda_K$           | Tamaño de la microescala de Kolmogorov, longitud de los microtorbellinos                                 | m                  |
| $\mu_{ap}, \mu$       | Velocidad específica aparente de crecimiento   | $h^{-1}$           |
| $\mu_{max}$           | Velocidad específica máxima de crecimiento   | $h^{-1}$           |
| $\pi$                 | Constante Pi   | -                  |
| $\rho$                | Densidad   | $kg/m^3$           |
| $\tau$                | Esfuerzo de corte o cizalla  | $N/m^2, kg/cm s^2$ |
| $\tau'_{m\acute{a}x}$ | Esfuerzo de corte máximo en tanques agitados, en la zona cercana al impulsor                             | $N/m^2$            |
| $\tau_{m\acute{a}x}$  | Esfuerzo de corte máximo en tanques agitados   | $N/m^2$            |
| $\tau_w$              | Esfuerzo de corte máximo en tubería cilíndrica   | $N/m^2$            |
| $\nu$                 | Viscosidad cinemática  | $m^2/s$            |

---

---

## RESUMEN

En la industria biotecnológica, el método principal para el cultivo de células animales es el de suspensión en tanques agitados o columnas de burbujeo. Para suplir adecuadamente las necesidades nutricionales al cultivo es necesario mantener condiciones homogéneas en el medio. En escala de producción esto constituye un reto, debido a razones económicas y mecánicas, además de la inherente fragilidad de las células animales al daño mecánico provocado por estrés hidrodinámico. Los problemas de mezclado ocasionados por estas restricciones pueden generar heterogeneidades ambientales o gradientes, que pueden afectar negativamente el desarrollo del cultivo.

La evaluación de estos problemas en gran escala es costosa y poco práctica, por lo que se presenta la necesidad de estudiarlas a nivel de laboratorio. En este trabajo se presenta, dentro del contexto del escalamiento descendente, el diseño y evaluación de sistemas de doble compartimento para simular gradientes de oxígeno disuelto, con tiempos de circulación y relaciones de volumen bien mezclado a mal mezclado similares a los esperados en escala industrial, usando condiciones de estrés hidrodinámico inferiores a las reportadas como letales y subletales para este tipo de cultivos.

Para esto, se diseñaron simuladores de doble compartimento STR/PFR (tanque agitado/flujo tapón) y PFR/PFR (flujo tapón/flujo tapón), en los que fue posible obtener gradientes de oxígeno disuelto de 20 a 0 % en medio acuoso sin células. Estos gradientes se simularon con tiempos de circulación entre 227.3 y 625 s y relaciones de volumen bien mezclado a mal mezclado de 3.0 a 10.3 en el sistema STR/PFR y de 0.69 a 1.24 en el PFR/PFR. Los parámetros simulados en estos sistemas fueron similares a los esperados en cultivos de células animales. Los esfuerzos de corte calculados para el flujo en las tuberías de ambos sistemas estuvieron entre 0.58 y 1.96 N/m<sup>2</sup>, los cuales representan niveles de estrés hidrodinámico inferiores a los reportados como letales y subletales para células animales. Sin embargo, tanto las células de *insecto* (Tn-4h y H5) como las de *mamífero* (CHO) probadas en ambos sistemas de doble compartimento fueron incapaces de crecer con oxígeno disuelto constante no limitante, posiblemente debido a la exposición intermitente y prolongada a los esfuerzos de corte mencionados. Debido a esto no fue posible evaluar el efecto de

los gradientes sobre la producción de fosfatasa alcalina humana recombinante en células animales.

No obstante, en *cultivos con la línea celular Tn-4h de insecto* realizados en un biorreactor de doble compartimento recirculado, en el que las células estuvieron expuestas a esfuerzos de corte de 0.02 y 0.07 N/m<sup>2</sup>, se observó crecimiento celular y producción de proteína heteróloga al ser infectadas con un baculovirus recombinante (derivado del baculovirus AcNPV, al que se ha insertado el gen de la fosfatasa alcalina secretada bajo el control del promotor de la poliedrina). En este sistema se registraron reducciones tanto en la velocidad específica de crecimiento (7.7 %) como en la concentración celular máxima alcanzada (hasta de 43.5 %), con respecto al cultivo control sin recirculación. Así mismo, se registraron reducciones de hasta 40.5 y 83.2 % en las velocidades de consumo y producción de glucosa y lactato en la etapa preinfección, con rendimientos biomasa/glucosa y lactato/glucosa hasta 1.95 y 0.6 veces los registrados en el cultivo control. En la etapa postinfección, la velocidad de consumo de glucosa fue hasta 55.5 % inferior al control, mientras que la velocidad de producción de lactato y el rendimiento lactato/glucosa tuvieron decrementos de 63 y 42 %, respectivamente, al aumentar el estrés hidrodinámico. Estos cambios al parecer indican que el carbono de la glucosa se está dirigiendo en mayor medida hacia las rutas de biosíntesis, en vez de utilizarlo para obtener energía. La producción volumétrica de proteína recombinante también disminuyó (entre 43.2 y 67.8 %) al incrementarse el estrés hidrodinámico causado por la recirculación. Aún así, las producciones volumétricas de proteína recombinante obtenidas en este biorreactor, tanto con recirculación como sin ella, fueron hasta 7.4 y 13.1 veces superiores a las obtenidas en frascos agitados “*spinner*” y en cultivos estáticos, respectivamente.

En el análisis del perfil de glicosilación de la fosfatasa alcalina humana recombinante, producida en condiciones de recirculación, se encontró que al incrementarse el esfuerzo de corte la proporción de glicanos complejos aumentó de 19.6 % en el cultivo control sin recirculación, hasta 34.3 y 40.4 % en los cultivos sometidos a estrés hidrodinámico, de los cuales la mayor parte fueron estructuras con ácido siálico terminal completamente sializadas. Esta proporción de glicanos complejos es de 1.7 a 2 veces superior a la observada en cultivos estáticos. Aparentemente esto se realizó a expensas de la reducción en la cantidad de estructuras

de tipo paucimanosa, ya que al haber menor producción de proteína recombinante hubo mayor oportunidad de no saturar la maquinaria de edición de los glicanos en el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico.

---

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas para la producción de proteínas recombinantes (PR) para uso terapéutico han sido tradicionalmente basados en el cultivo de procariotes y eucariotes inferiores (bacterias y levaduras). Sin embargo, estos microorganismos generalmente no realizan las modificaciones postraduccionales necesarias para la adecuada función de estas proteínas, o las modifican de forma diferente a como lo hacen las células humanas. Debido a esto, en las últimas dos décadas se han utilizado sistemas de producción basados en el cultivo de células de eucariotes superiores, particularmente células animales (CA), debido a que son capaces de realizar modificaciones postraduccionales similares a las de proteínas de origen humano.

En la industria biotecnológica el método de cultivo de CA es principalmente el de células en suspensión, en tanques agitados o en columnas de burbujeo, ya sea como células individuales, aglomerados celulares o células adheridas a microacarreadores. En estos sistemas a gran escala se han reportado cultivos por lote, continuos y de perfusión de hasta 15 000, 2 000 y 400 L, respectivamente (Griffiths, 1991; Griffiths, 1992; Werner et al., 1992).

Para garantizar un adecuado suministro de nutrientes a todas las células del cultivo es necesario mantener condiciones homogéneas en el medio. Esto se logra con relativa facilidad en biorreactores de laboratorio, que usualmente tienen un mezclado eficiente y altas velocidades de transferencia de masa, debido a la alta potencia transmitida al medio de cultivo. Sin embargo, en escala de producción la potencia transmitida al medio está restringida por razones económicas y mecánicas. Además, debido a la fragilidad de las CA al daño mecánico, los cultivos deben realizarse en condiciones de bajo estrés hidrodinámico. Estas condiciones ocasionan problemas de mezclado, de transferencia de masa y de calor, que pueden provocar la formación de heterogeneidades ambientales o gradientes. Usualmente todo esto resulta en la reducción del rendimiento de biomasa y PR, aunque también es posible que provoque un incremento en la formación de ciertos metabolitos (Sweere et al., 1987).

Para el estudio de estos problemas la experimentación en biorreactores de escala industrial es costosa y poco práctica. Sin embargo, a nivel de laboratorio ha sido

posible simular las condiciones que prevalecen -o que se podrían presentar- en cultivos de gran escala, utilizando una metodología denominada *escalamiento descendente*. Para esta estrategia se han diseñado biorreactores de pequeña escala en los que se pueden crear heterogeneidades ambientales, con el fin de evaluar sus efectos sobre los cultivos (Palomares y Ramírez, 2000a). Estos simuladores de laboratorio han funcionado bien para cultivos de bacterias como *Escherichia coli* (Sandoval, 2003), pero al adaptarlos a cultivos de CA se presentan dificultades debido a la fragilidad celular, que hace necesario operar los biorreactores en condiciones de bajo estrés hidrodinámico (baja agitación y burbujeo).

Algunas configuraciones de biorreactores para simulación experimental se han diseñado y aplicado ya en cultivos de hibridomas (Serrato, 2002). Sin embargo, en estos sistemas hasta el momento no ha sido posible generar gradientes semejantes a los que se esperan en escala industrial. Resulta entonces necesario diseñar y evaluar otros sistemas en los que se puedan simular adecuadamente estas heterogeneidades ambientales, para estudiar su efecto en cultivos de CA. Por todo lo anterior, se presenta en este trabajo la evaluación de sistemas de doble compartimento para cultivos de CA, diseñados para simular gradientes de oxígeno disuelto similares a los esperados en biorreactores de escala industrial, en condiciones de estrés hidrodinámico inferiores a las reportadas como letales para cultivos de hibridomas y células de insecto (CI).

---

---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Producción de proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico es una de las aplicaciones de la biotecnología moderna que ha cobrado una gran importancia en los últimos años. Los sistemas para la producción heteróloga de proteínas han sido tradicionalmente basados en el cultivo de microorganismos procariotes y eucariotes inferiores. Para la producción de proteínas recombinantes (PR), estos microorganismos tienen la desventaja de que, la mayoría de las veces, las PR son producidas de manera insoluble e inactivas en el citoplasma bacteriano. Además, las células de bacterias y levaduras no realizan las modificaciones postraduccionales típicas de células humanas (proteólisis, glicosilación, fosforilación, acilación, amidación, carboximetilación, isopentilación, etc.), las que son necesarias para la adecuada función de las PR como medicamentos para humanos (Luckow y Summers, 1988).

La utilización de sistemas basados en cultivos de células animales ha permitido contender con estos problemas, ya que éstas pueden realizar las modificaciones postraduccionales necesarias para que las PR sean utilizadas como medicamentos para humanos (Palomares y Ramírez, 2002). El uso de células de mamífero da como resultado la obtención de proteínas similares a las humanas tanto en plegamiento como en modificaciones postraduccionales. Entre las líneas celulares más utilizadas destacan las células de ovario de hámster chino (CHO, “*Chinese Hamster Ovary cells*”) (Page y Sydenham, 1991; Lindberg et al., 1991; Cosgrove et al., 1995), las células de riñón de hámster bebé (BHK, “*Baby Hamster Kidney cells*”) (Wirth et al., 1988) y los hibridomas, entre otras. Estas células se han utilizado en la producción de proteínas terapéuticas, como factores de crecimiento y anticuerpos monoclonales, así como en terapia génica (Riad y Padh, 2001).

Otra estrategia que ha ganado importancia es la utilización de líneas celulares de insecto, principalmente de lepidópteros como *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. En estos sistemas de producción las células son infectadas con un baculovirus recombinante, que contiene el gen que codifica para la PR de interés. Además de la inocuidad para el ser humano, este sistema cuenta entre sus ventajas un rendimiento de

PR de 20 a 250 veces superior al observado en cultivos de células de mamífero (Bettenbaugh et al., 1999). El sistema de células de insecto-baculovirus (CI-BV) ha sido utilizado para la producción de oncoproteínas (Meij et al., 2000), proteínas de la matriz extracelular (Misenheimer et al., 2000), proteínas involucradas en la transducción de señales (Rankl et al., 1994), chaperonas (Cala, 2000), proteínas del sistema nervioso central (Nguyen et al., 1993), partículas virales para estudios inmunológicos y terapéuticos (Smith et al., 1983b; Horiuchi et al., 1987; Chazenbalk y Rapoport, 1995),  $\beta$ -galactosidasa (van Lier et al., 1994), factor de crecimiento del nervio humano (rhNGF, Lindsay y Bettenbaugh, 1992), interferón (Horiuchi et al., 1987; Smith et al., 1983a) y vacunas contra la fiebre aftosa (Roy et al., 1992), entre otras aplicaciones. Recientemente se ha aprobado el primer medicamento para uso humano producido por CI: la vacuna contra el virus de papiloma humano, Cervarix (GlaxoSmithKline Bechman), la que ya cuenta con licencia en México.

## **2.2. Glicosilación de proteínas.**

El procesamiento postraduccional es fundamental para la función de las proteínas. La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más complejas, que consiste en la adición de oligosacáridos a la cadena polipeptídica, en residuos de aminoácidos específicos. Esto afecta la actividad biológica de las proteínas de interés terapéutico, modificando sus características de solubilidad, antigenicidad, permanencia en el torrente sanguíneo, inmunogenicidad y resistencia tanto a la inactivación térmica como al ataque por proteasas (Gooche y Monica, 1990; Gooche et al., 1991).

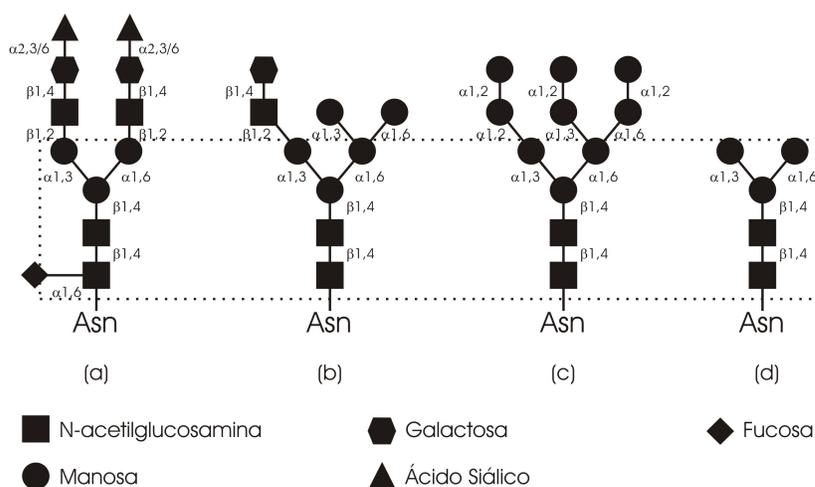
La gran mayoría de las proteínas extracelulares y asociadas a membranas son glicoproteínas. Los oligosacáridos, que están unidos a las mismas mediante enlaces covalentes, están formados principalmente por N-acetil glucosamina (N), fucosa (F), manosa (M), galactosa (G) y ácido siálico (S). Estos oligosacáridos pueden estar enlazados a la proteína mediante uniones denominadas O- y N-glicosilación. La O-glicosilación es la unión entre un oligosacárido y un grupo -OH de residuos de serina (Ser), treonina (Thr) o hidroxilisina; mientras que la N-glicosilación es la unión de un oligosacárido al grupo amida de un residuo de asparagina (Asn), en una secuencia específica como Asn-X-(Ser/Thr), donde X es cualquier aminoácido,

excepto prolina (Pro) o ácido aspártico (Asp). Un mismo sitio de N-glicosilación en diferentes moléculas de proteína puede contener glicanos con diferentes estructuras, lo que es conocido como microheterogeneidad. Por otra parte, la ocupación de los diferentes sitios de N-glicosilación en una proteína se conoce como macroheterogeneidad. También es posible que no todos los sitios consenso estén glicosilados.

### 2.2.1. N-glicosilación.

Los N-glicanos están compuestos por un pentasacárido común, denominado núcleo quitobiosa, compuesto por dos unidades de N y tres unidades de M, formando una estructura con dos ramificaciones (antenas) (Figura 2.1). Dependiendo de los azúcares que se agreguen a estas dos antenas, los N-glicanos pueden clasificarse como: *oligosacáridos complejos*, que tienen S, G o N como residuos terminales (Figura 2.1a); *oligosacáridos con alto contenido de manosa*, con manosas adicionales unidas al núcleo quitobiosa (Figura 2.1c); *oligosacáridos híbridos*, una mezcla de antenas con S, N o G terminal y antenas con manosas (Figura 2.1b); y *paucimanosas*, que son oligosacáridos truncados (Figura 2.1d) (Gooche et al., 1991; Gooche y Monica, 1990; Palomares et al., 2006).

La N-glicosilación se lleva a cabo antes de que la proteína sea secretada o transportada a la membrana celular, involucrando la adición y remoción secuencial de carbohidratos por la acción de glicosil transferasas y glicosidasas, primero en el retículo

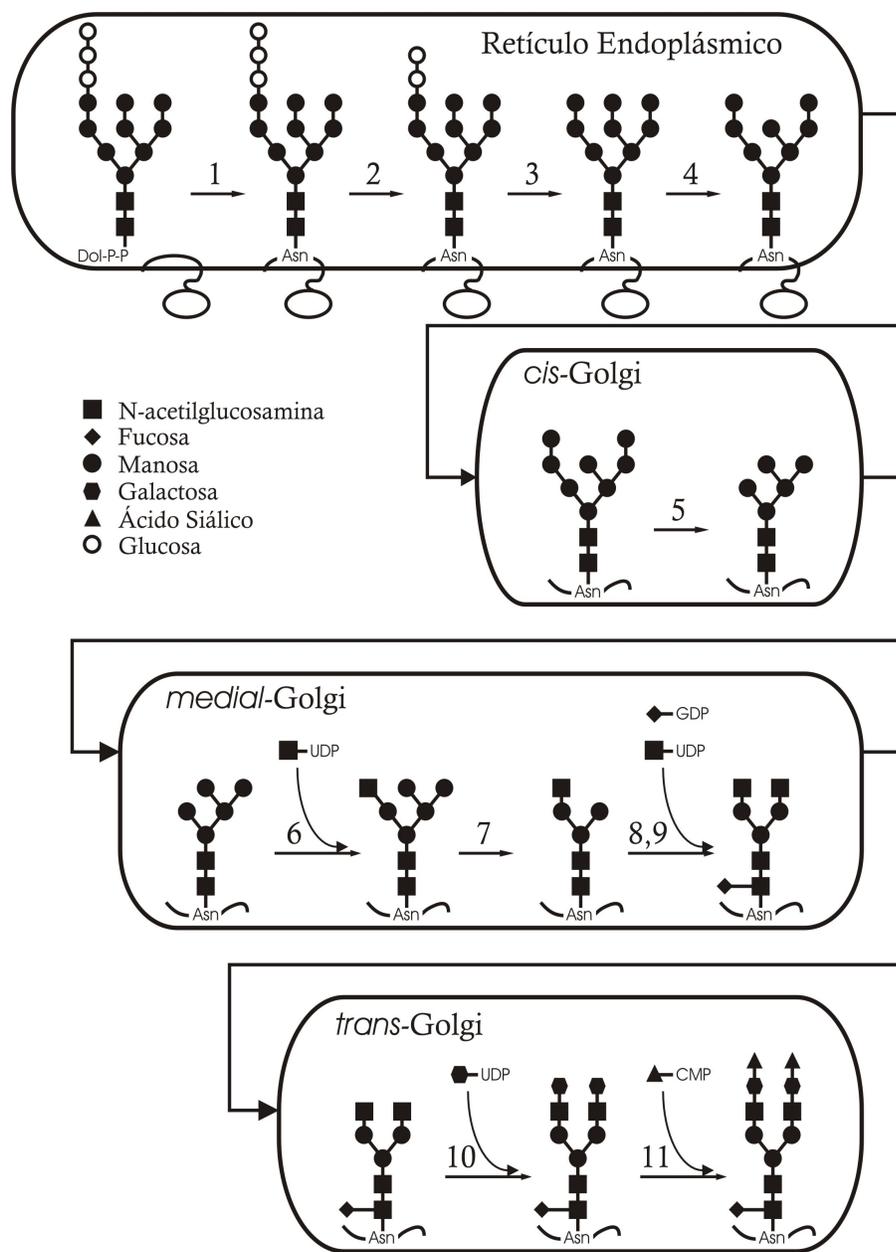


**Figura 2.1. Ejemplos de N-glicanos: (a) complejo, (b) híbrido, (c) alto en manosa y (d) paucimanoso. Se muestra el núcleo quitobiosa encerrado en la línea punteada.**

endoplásmico y luego en el aparato de Golgi (Figura 2.2). En primer lugar, el oligosacárido  $\text{Glc}_3\text{M}_9\text{N}_2$  (Glc = Glucosa) es transferido del acarreador lipídico dolícil difosfato (Dol-P-P) a una asparagina (Asn) de la proteína naciente, en el retículo endoplásmico, por la acción de la oligosacaril transferasa que se encuentra asociada a los ribosomas (Figura 2.2, paso 1). Una serie de reacciones catalizadas por exoglicosidasas ocurren en el retículo endoplásmico, resultando en la estructura alta en manosa  $\text{M}_8\text{N}_2$  (Figura 2.2, pasos 2, 3 y 4). Esta estructura es transportada al aparato de Golgi, donde las manosidasas y N-acetilglucosaminil transferasas la transformarán en glicanos híbridos y complejos (Figura 2.2, pasos 5, 6, 7, y 8). La  $\alpha 1,6$ -fucosilación (Figura 2.2, paso 9) es una característica estructural común entre los N-glicanos de células de mamífero. Por último, el procesamiento adicional por parte de la galactosil transferasa y sialil transferasa dará como resultado los N-glicanos galactosilados y sialidados característicos de células de mamífero (Figura 2.2, pasos 10 y 11) (Gooche et al., 1991; Jenkins y Shah, 1999; Palomares y Ramírez, 2002).

### 2.2.2. N-glicosilación en células de insecto

Existen trabajos en los que se ha reportado que las CI no tienen capacidad para realizar glicosilación de tipo complejo, pues sólo se encontraron proteínas con N-glicanos altos en manosa y paucimanosas. Estos análisis de glicosilación han sido determinados mediante técnicas cualitativas poco sensibles, como el marcado con lectinas y la electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (Gooche et al., 1991; Davis et al., 1993; Jarvis y Finn, 1995; Zhang et al., 2002). Por el contrario, en otros estudios donde el perfil de glicosilación se ha evaluado con técnicas cuantitativas más sensibles, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, “*High Performance Liquid Chromatography*”) y espectrometría de masas, se ha encontrado que estas células sí pueden producir glicanos complejos e incluso sialidados (Davidson y Castellino, 1991; Davis y Wood, 1995; Joshi et al., 2000; Joshi et al., 2001; Palomares et al., 2003). Esto se ha observado en líneas celulares obtenidas de *Pseudaletia unipuncta* (A7S), *Danaus plexippus* (DpN1), *Trichoplusia ni* (Tn5B1-4 y Tn-4h), *Spodoptera frugiperda* (Sf21) y *Mamestra brassicae* (MBO503), que pueden producir proteínas recombinantes con 5 a 63 % de N-glicanos complejos y de 13 a 33 % de N-glicanos complejos con ácido siálico terminal (Tabla 2.1). Sin embargo, la proporción de



**Figura 2.2. Procesamiento de N-glicanos en células animales.** Las enzimas son: (1) oligosacaril transferasa, (2)  $\alpha$ -glucosidasa I, (3)  $\alpha$ -glucosidasa II, (4)  $\alpha$ 1,2-manosidasa del retículo endoplásmico, (5)  $\alpha$ -manosidasas I del Golgi, (6) N-acetilglucosaminil transferasa I, (7)  $\alpha$ -manosidasas II del Golgi, (8) N-acetilglucosaminil transferasa II, (9)  $\alpha$ 1,6-fucosil transferasa, (10)  $\beta$ 1,4-galactosil transferasa, (11)  $\alpha$ 2,3-sialil transferasa. Dol-P-P es dolícil difosfato. Los cosustratos de las reacciones 6, 8, 9, 10 y 11 son formas activadas de los monosacáridos, donde: UDP es uridina difosfato, GDP es guanosina difosfato y CMP es citidina monofosfato (adaptado de Gooche et al., 1991).

**Tabla 2.1. Algunos perfiles de glicosilación observados en CI (tomado de Palomares y Ramírez, 2002).**

| <b>Línea Celular</b>   | <b>Alta Manosa (%)</b> | <b>Paucimanosas<sup>g</sup> (%)</b> | <b>Híbridas (%)</b> | <b>Complejas (%)</b> | <b>Sialidades (%)</b> |
|------------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Sf9 <sup>a</sup>       | ND                     | 81                                  | 19                  | ND                   | ND                    |
| Sf9 <sup>c</sup>       | 16                     | 84                                  | ND                  | ND                   | ND                    |
| Tn-4h <sup>c,f</sup>   | 13                     | 86                                  | 1                   | ND                   | ND                    |
| Tn5B1-4 <sup>d</sup>   | 31                     | 55                                  | 14                  | ND                   | ND                    |
| Tn5B1-4 <sup>c</sup>   | 20                     | 71                                  | 4                   | 5                    | ND                    |
| A7S <sup>c</sup>       | 33                     | 55                                  | 4                   | 8                    | ND                    |
| DpN1 <sup>c</sup>      | 24                     | 44                                  | 6                   | 26                   | 13                    |
| Tn5B1-4 <sup>b</sup>   | ND                     | 35                                  | 30                  | 35                   | ND                    |
| Sf21 <sup>e</sup>      | 50                     | 10                                  | ND                  | 30                   | 30                    |
| Ea4 <sup>a</sup>       | ND                     | 22                                  | 36                  | 42                   | ND                    |
| Tn-4h <sup>c,f,h</sup> |                        | 36 <sup>i</sup>                     |                     | 44 <sup>j</sup>      | 20                    |
| Tn-4h <sup>c,f</sup>   | 6                      | 43                                  | 3                   | 48                   | ND                    |
| MBO503 <sup>e</sup>    | 35                     | 2                                   | ND                  | 63                   | 33                    |

(ND) No detectada.

(<sup>a</sup>) Glicoformas observadas en Asn25 de interferón  $\gamma$  (Ogonah et al., 1996).

(<sup>b</sup>) Glicoformas observadas en IgG (Hsu et al., 1997).

(<sup>c</sup>) Glicoformas observadas en SeAP (Palomares et al., 2003; Joshi et al., 2000; Joshi et al., 2001).

(<sup>d</sup>) Glicoformas observadas en transferrina humana (Ailor et al., 2000).

(<sup>e</sup>) Glicoformas observadas en plasminógeno humano (Davidson et al., 1990; Davidson y Castellino, 1991).

(<sup>f</sup>) La línea Tn-4h es derivada de la línea Tn5B1-4.

(<sup>g</sup>) Estructuras con tres o menos manosas.

(<sup>h</sup>) Cultivada en microgravedad simulada (reactor HARV) (Joshi et al., 2001).

(<sup>i</sup>) Estructuras (altas en manosa + paucimanosa).

(<sup>j</sup>) Estructuras (híbridas + complejas).

N-glicanos altos en manosa y paucimanosas puede constituir de 22 a 100 % de las glicoformas encontradas (Tabla 2.1) (Palomares y Ramírez, 2002).

Las glicoformas altas en manosa son el resultado de un procesamiento incompleto en el aparato de Golgi, probablemente causado por sobresaturación de la maquinaria de glicosilación. Por otra parte, las estructuras paucimanosa son el resultado de una N-acetil glucosaminidasa ya identificada en CI, que corta los residuos de N del glicano (Altmann et al., 1995; Wagner et al., 1996; Palomares et al., 2003). Las glicoformas paucimanosa no son sustrato de las galactosil transferasas, por lo que

interrumpen el procesamiento posterior del glicano, evitando la adición de G. Otra desventaja de las CI es que se ha detectado que hasta el 18 % de las glicofomas pueden estar  $\alpha$ 1,3 fucosiladas en el núcleo quitobiosa. Esta modificación es inmunogénica para mamíferos, que realizan  $\alpha$ 1,6 fucosilación (Hsu et al., 1997; Altmann et al., 1999).

Existe evidencia de que el ambiente extracelular, además de afectar el crecimiento celular y el rendimiento de proteína recombinante, también puede afectar la glicosilación, tanto en células de mamífero como de insecto. Algunos de estos factores son: concentración celular, viabilidad, tiempo de cosecha (Agathos, 1996), concentración de glucosa y amonio en el medio de cultivo (Thorens y Vassalli, 1986; Gooche et al., 1991; Gawlitzek et al., 1998; Yang y Butler, 2000), multiplicidad y tiempo de infección (Licari y Bailey, 1991), concentración de CO<sub>2</sub> (Hu y Aunins, 1997; Zhang et al., 1999), presencia o ausencia de suero fetal bovino en el medio de cultivo (Joshi et al., 2000; Serrato et al., 2007), oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Agathos, 1996; Donaldson et al., 1999; Kunkel et al., 1998; Taticek et al., 2001; Zhang et al., 2002; Serrato et al., 2004) y estrés hidrodinámico por esfuerzos de corte (Gooch et al., 2001; Senger y Karim, 2003; Godoy-Silva et al., 2009).

### 2.3. Escalamiento

Algunos de los cultivos de células animales de mayor escala reportados se encuentran entre los 500 y los 10 000 L (Palomares y Ramírez, 2000b). Para asegurar un adecuado suministro de nutrientes a todas las células, incluyendo el oxígeno, además de eliminar zonas donde se acumulen compuestos tóxicos para las mismas, como dióxido de carbono, lactato u otros ácidos orgánicos, el ambiente de cultivo debe ser homogéneo. Esto se logra con un mezclado eficiente, que influye directamente en la transferencia de masa y de calor, los cuales dependen de las características geométricas y las variables de operación del biorreactor.

Lograr un adecuado mezclado en biorreactores de laboratorio es relativamente sencillo. Sin embargo, en escala de producción esto constituye un reto debido a dificultades económicas y mecánicas, además de la inherente sensibilidad celular al daño mecánico. Según O'Reilly et al., 1994, estos cultivos deben realizarse con baja

agitación y burbujeo, es decir, menos de 170 rpm y 0.07 vvm. En cultivos de células CHO, hibridomas, mielomas y CI se ha reportado que el mezclado deficiente en biorreactores tipo tanque agitado ocasiona problemas significativos a altas concentraciones celulares, como acumulación de dióxido de carbono, gradientes de pH, lisis celular en zonas de adición de base y segregación celular (Palomares y Ramírez, 2000b).

### 2.3.1. Escalamiento descendente

Ya que la experimentación en biorreactores de gran escala es costosa y poco práctica, para estudiar estos problemas se utiliza el *escalamiento descendente*, que consiste en reproducir en escala de laboratorio las condiciones que prevalecen (o que pueden presentarse) en cultivos de escala industrial. Esta metodología consiste en cuatro etapas: *análisis de régimen*, *simulación*, *optimización* y *aplicación*.

#### 2.3.1.1. Análisis de régimen

El análisis de régimen se basa en la identificación de los mecanismos limitantes de un bioproceso a gran escala. Esto se logra mediante la obtención y análisis de los tiempos característicos (también llamados constantes de tiempo), como el *tiempo de mezclado*<sup>1</sup> ( $t_M$ ), el *tiempo de circulación*<sup>2</sup> [ $t_C$ , ecuación (2-1)], el *tiempo de transferencia de masa*<sup>3</sup> [ $t_{tm}$ , ecuación (2-2)] y el *tiempo de reacción*<sup>4</sup> [ $t_{rxn}$ , ecuación (2-3)], entre otros. Mientras más pequeño es un tiempo característico, más rápido es un proceso. Para cultivos de CA, se estima que el  $t_M$  puede estar entre 200 a 1 000 s ( $t_C$  entre 50 y 250 s) en biorreactores air-lift, y de 40 a 200 s ( $t_C$  entre 10 y 50 s) en tanques agitados, alcanzando hasta 3 120 s en reactores STR con sistemas de perfusión (Jem et al., 1994). En comparación, los tiempos para el control de la transcripción, la inducción enzimática y el tiempo de generación pueden ser mayores a los 10 s. Cuando los

<sup>1</sup> El *tiempo de mezclado* ( $t_M$ ) se define como el tiempo requerido por un sistema para alcanzar un grado específico de uniformidad (Palomares y Ramírez, 2000b).

<sup>2</sup> El *tiempo de circulación* ( $t_C$ ) se define como el tiempo necesario para que un elemento de fluido retorne a una posición de referencia, después de haber circulado por el biorreactor (Palomares y Ramírez, 2000a).

<sup>3</sup> El *tiempo de transferencia de masa* ( $t_{tm}$ ), en este caso de oxígeno, es el tiempo en el que el sistema es capaz de alcanzar el 63.2 % de la concentración de saturación de oxígeno en el medio, a partir de 0 % de OD.

<sup>4</sup> El *tiempo de reacción* ( $t_{rxn}$ ) se define como el tiempo en que el cultivo agotaría determinada concentración de un sustrato particular en el medio de cultivo.

tiempos característicos de los mecanismos intracelulares son del mismo orden de magnitud que los de los cambios en el ambiente extracelular, puede haber interacción entre los dos procesos y afectar el comportamiento del cultivo. Aunado a lo anterior, un proceso lento (con un tiempo característico grande) puede ser un factor potencialmente limitante. Por ejemplo, si el  $t_M > t_{rxn}$  pueden presentarse problemas de mezclado (gradientes) y si el  $t_{tm} > t_{rxn}$  puede presentarse limitación por oxígeno (Palomares y Ramírez, 2000a).

$$t_c = \frac{t_M}{4} \quad (2-1)$$

$$t_{tm} = \frac{1}{k_L a} \quad (2-2)$$

donde:

$k_L a$  = coeficiente volumétrico de transferencia de masa para oxígeno ( $s^{-1}$ )

$$t_{rxn} = \frac{C}{q_{O_2} X_v} \quad (2-3)$$

donde:

$C$  = concentración de oxígeno disuelto (mg/mL),

$q_{O_2}$  = velocidad específica de consumo de oxígeno (mg/célula s),

$X_v$  = concentración celular viable (células/mL).

Desde el punto de vista técnico, la transferencia de oxígeno es uno de los mayores retos en el escalamiento de biorreactores para el cultivo de células eucariotes superiores (Palomares y Ramírez, 2000b). Debido a su baja solubilidad en medios acuosos (<10 mg/L), el oxígeno es uno de los nutrientes que debe ser suministrado continuamente a un cultivo. En cultivos de células de mamífero, la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ) está reportada entre  $4 \times 10^{-11}$  y  $15 \times 10^{-11}$  mmol/célula h, alcanzando concentraciones celulares típicas de hasta  $1 \times 10^7$  células/mL en microacarreadores (Hu y Wang, 1986). Esto equivale a velocidades de consumo de oxígeno (VCO) de hasta 1.50 mmol/L h, que en cultivos con OD igual a 100, 25 y 4 %<sup>5</sup>, corresponden a  $t_{rxn}$  de 10.2, 2.6 y 0.4 min, respectivamente [ver ecuación (2-3)].

<sup>5</sup> El OD se da en porcentaje respecto a la saturación con aire. A 27 °C, 100 % OD = 0.2559 mmol/L.

En comparación con células de mamíferos, en CI la  $q_{O_2}$  es en general más alta, además de incrementarse en ocasiones hasta un 100 % después de la infección con un baculovirus recombinante (Scott et al., 1992; Kamen et al., 1996). Se ha observado que en células no infectadas de la línea celular Sf9 (derivada de *Spodoptera frugiperda*) se presentan  $q_{O_2}$  entre  $7 \times 10^{-11}$  y  $36 \times 10^{-11}$  mmol/célula h (Palomares y Ramírez, 1996). Así mismo, en cultivos no infectados de la línea BTI-Tn-5B1-4 (derivada de *Trichoplusia ni*), se han reportado valores de  $q_{O_2}$  entre  $18 \times 10^{-11}$  y  $59.4 \times 10^{-11}$  mmol/célula h, con incrementos hasta de 33 % después de la infección (Rhiel et al., 1997). Considerando este incremento en la demanda de oxígeno, un cultivo de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas tendría una  $q_{O_2}$  entre  $24 \times 10^{-11}$  y  $79 \times 10^{-11}$  mmol/célula h. Con una densidad celular típica de  $8 \times 10^6$  células/mL (Palomares y Ramírez, 2000b) este cultivo alcanzaría valores de VCO entre 1.92 y 6.32 mmol/L h, en el que los  $t_{rxn}$  [ecuación (2-3)] para 100 % de OD estarían entre 2.4 y 8 min, entre 0.6 y 2 min para 25 % de OD, y entre 0.1 y 0.3 min para 4 % de OD.

En cultivos bacterianos se ha reportado la existencia de gradientes de oxígeno disuelto (OD), en donde el mezclado deficiente genera regiones con OD limitante (de 0 a 3 %), en la cercanía de las paredes del biorreactor, mientras que en la región cercana a los impulsores el OD es más alto (de 20 a 25 %) (Oosterhuis y Kossen, 1984). Se estima que estos gradientes pueden presentarse también en cultivos de CA a gran escala (Tramper, 1995; Tramper et al., 1996a), en donde los coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) son del orden de  $5.47 \text{ h}^{-1}$  (por ejemplo, tanque agitado de 8 000 L, con burbujeo de aire) (Nienow et al., 1996), por lo que la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) es  $\leq 1.40$  mmol/L h. De acuerdo a la ecuación (2-2), a este  $k_L a$  le corresponde un  $t_{tm} = 11$  min, que para este tipo de cultivos describe a la transferencia de oxígeno como un proceso más lento que el consumo del mismo por las CA, de acuerdo con los  $t_{rxn}$  mencionados anteriormente.

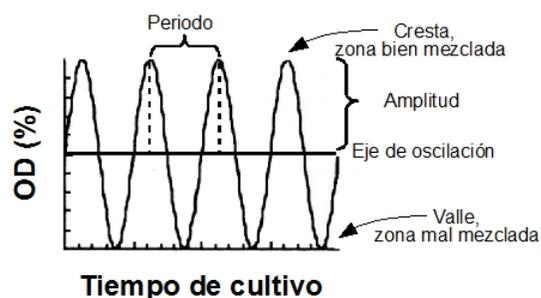
Por todo lo anterior, se pueden esperar problemas de disponibilidad de oxígeno para los cultivos de CA a escalas industriales, además de la formación de gradientes de OD, que pueden tener influencia tanto en el crecimiento celular como en el

rendimiento y modificación postraduccional de la PR.

### 2.3.1.2. Simulación

En esta etapa, los mecanismos limitantes identificados mediante el análisis de régimen de la escala de producción son simulados en escala de laboratorio. Para tener condiciones representativas de la escala industrial, los simuladores de laboratorio no necesariamente deben mantener similitudes geométricas con los biorreactores de producción. Sin embargo, es importante que se logren mantener constantes los tiempos característicos entre ambas escalas, además de simular adecuadamente la circulación de las células entre las zonas bien mezclada y mal mezclada del biorreactor, así como el tiempo de residencia ( $t_R$ ) en cada zona (Palomares y Ramírez, 2000a). Para estos fines se han diseñado los llamados *sistemas de uno* y *de dos compartimentos* que se describen a continuación.

Mediante el uso de *sistemas de un compartimento*<sup>6</sup> se pueden simular gradientes de OD, modificando periódicamente la composición de los gases de entrada al biorreactor mediante algoritmos de control computarizado, que permitan generar oscilaciones en la concentración de OD. Éstas pueden tener un perfil sinusoidal (Figura 2.3), con las crestas y valles representando el tránsito de las células de la zona bien mezclada a la mal mezclada, mientras que el periodo y la amplitud de la oscilación se relacionan con el  $t_C$  y la magnitud del gradiente, respectivamente. Uno de los aspectos cuestionables de este tipo de sistemas es que todas las células del cultivo son expuestas simultáneamente a la misma condición, lo que puede provocar fenómenos de sincronización que son poco probables en escalas de producción (Palomares y Ramírez, 2000a).



**Figura 2.3. Oscilación sinusoidal en un sistema de un compartimento para simular gradientes de OD.**

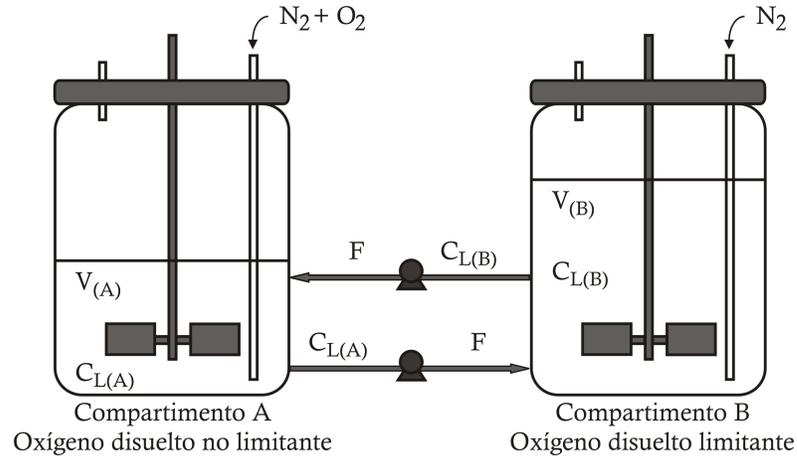
<sup>6</sup> Consisten usualmente de un tanque agitado, con volumen de trabajo menor a 1 L.

En cultivos de CA, cuyo  $k_{La}$  es pequeño debido a las condiciones de baja agitación y aireación superficial, estos sistemas tienen la desventaja de tener altos tiempos de respuesta. Por esta razón no es posible simular  $t_c$  pequeños, mientras que funcionan bien para cultivos bacterianos, dado que las condiciones de operación (alta agitación y burbujeo de gas) permiten trabajar con sistemas más dinámicos, con altos valores de  $k_{La}$ . Hasta el momento el menor  $t_c$  que se ha logrado simular en cultivos de CA es de 800 s, en un sistema de un compartimento para simular gradientes de OD en cultivos de hibridomas (Serrato, 2002). En contraste, para estos cultivos en escala de producción se esperan  $t_c$  entre los 10 y 250 s (Palomares y Ramírez, 2000a; Palomares y Ramírez, 2000b).

Los *sistemas de doble compartimento* usualmente consisten en dos tanques agitados interconectados (Figura 2.4), cada uno mantenido a una condición ambiental diferente, entre los que el cultivo se recircula mediante bombas peristálticas para simular el  $t_c$ <sup>7</sup>. En estos sistemas se pueden simular  $t_c$  menores a los alcanzados en los de un compartimento, con el inconveniente de que los esfuerzos de corte generados en los cabezales de las bombas pueden tener efecto perjudicial sobre cultivos sensibles a estrés hidrodinámico. Con frecuencia los compartimentos son de diferente volumen de operación, para mantener la relación de volumen bien mezclado a volumen mal mezclado observada en grandes escalas de producción (Palomares y Ramírez, 2000a). Las condiciones limitantes y no limitantes de OD se simulan mediante el ambiente controlado de cada compartimento, que en el estado estable se comportará de acuerdo con el balance de masa para oxígeno, descrito por las ecuaciones (2-4) y (2-5). Otra característica de estos sistemas dobles es la distribución de  $t_R$  en cada compartimento, que simula la distribución de  $t_c$  en biorreactores de producción. Sin embargo, es argumentable que las células pueden experimentar cambios escalonados entre los ambientes controlados de cada compartimento, contrario a lo que sucede en situaciones de producción, donde las células se mueven gradualmente entre dos condiciones (Palomares y Ramírez, 2000a).

---

<sup>7</sup> En sistemas de doble compartimento, el  $t_c = V_T / Q$ , donde  $V_T$  es el volumen total de cultivo (mL) y  $Q$  es el flujo de recirculación (mL/s).



**Figura 2.4. Diagrama de un sistema de doble compartimento STR/STR.**

Balace de oxígeno para el compartimento A (STR con OD no limitante):

$$\frac{dC_{L(A)}}{dt} = \frac{F}{V_{(A)}}C_{L(B)} + k_L a_{(A)}(C_{L(A)}^* - C_{L(A)}) - \frac{F}{V_{(A)}}C_{L(A)} - q_{O_2} X \quad (2-4)$$

Balace de oxígeno para el compartimento B (STR con OD limitante):

$$\frac{dC_{L(B)}}{dt} = \frac{F}{V_{(B)}}C_{L(A)} - \frac{F}{V_{(B)}}C_{L(B)} - k_L a_{(B)}(C_{L(B)} - C_{L(B)}^*) - q_{O_2} X \quad (2-5)$$

donde:

$C_{L(A)}$ ,  $C_{L(B)}$  = concentración de OD en los compartimentos A y B (mmol  $O_2/L$ ),

$t$  = tiempo (h),

$F$  = flujo de recirculación (L/h),

$V_{(A)}$ ,  $V_{(B)}$  = volumen de cultivo en los compartimentos A y B (L),

$k_L a_{(A)}$ ,  $k_L a_{(B)}$  = coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno en los compartimentos A y B ( $h^{-1}$ ),

$C_{L(A)}^*$ ,  $C_{L(B)}^*$  = concentración de OD a la saturación (mmol  $O_2/L$ ), de acuerdo con la temperatura del medio y la proporción de  $O_2$  en el gas de entrada al biorreactor<sup>8</sup>. En el compartimento A varía con la composición del gas de entrada, modificada por el control computarizado. En el compartimento B es cero debido a la entrada de  $N_2$  usada para la desorción del  $O_2$ .

<sup>8</sup> De acuerdo con la Ley de Henry: A temperatura constante, la cantidad de gas disuelto en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial que ejerce ese gas sobre el líquido. Es decir:  $C = (C_{\text{líquido}} p_{\text{gas}}) / H$ , donde  $C$  es la concentración del gas disuelto (mmol/L),  $C_{\text{líquido}}$  es la concentración molar del líquido (para el agua: 55 555.55 mmol/L),  $p_{\text{gas}}$  es la presión parcial del gas (atm) y  $H$  es la constante de Henry (atm) (para  $O_2$  en agua a 27 °C,  $H = 45\,603.31$  atm). Con agua a 27 °C y aire ( $p_{\text{oxígeno}} = 0.21$  atm),  $C = 0.2558$  mmol  $O_2/L$  (Perry et al., 1992).

Los sistemas de doble compartimento se han aplicado eficazmente en cultivos bacterianos, en los que se han obtenido gradientes desde 10 a 0 % de OD, con  $t_c$  mínimos de 50 s (Sandoval, 2003). Es posible también simular los  $t_c$  estimados en cultivos de CA a gran escala, utilizando volúmenes de cultivo y flujos de recirculación menores a 500 mL y 4 mL/s. Sin embargo, simular gradientes de OD representativos de los que se esperan en escala de producción no es tan sencillo, debido a que en las condiciones típicas de cultivo los biorreactores tienen bajos valores de  $k_{La}$ , incluso en escala de laboratorio.

### 2.3.1.3. Optimización y Aplicación

Una vez identificados los mecanismos limitantes y establecidos los métodos para simularlos en escala de laboratorio, se procede a la optimización. Esto consiste en estudiar un amplio espectro de condiciones sobre el metabolismo y fisiología celular. Esto incluirá la evaluación del efecto del *período*, la *amplitud* y el *eje* de las oscilaciones de una variable de cultivo en particular, que representarán al  $t_c$ , la *magnitud* de los gradientes y la *condición ambiental promedio* de la escala de producción, respectivamente (Palomares y Ramírez, 2000a).

El paso final en la metodología de escalamiento descendente es la aplicación. Consiste en trasladar los resultados obtenidos de la escala de laboratorio a la escala de producción. Si el escalamiento descendente revela la ausencia de efectos adversos causados por los gradientes, pueden existir situaciones donde una operación intermitente podría ser benéfica en escala de producción. Por ejemplo, cuando un cultivo celular es insensible a algún gradiente de OD particular, entonces se podría ahorrar energía y reducir el estrés hidrodinámico mediante mezclado y/o burbujeo intermitente (Palomares y Ramírez, 2000a).

## 2.4. Estrés hidrodinámico

El crecimiento de CA en suspensión tiene, a diferencia de los cultivos estáticos, algunas dificultades debidas a la fragilidad de las células al daño mecánico, el cual a su vez se relaciona directamente con las condiciones hidrodinámicas presentes en el cultivo. Este factor se debe considerar cuidadosamente al diseñar biorreactores para el cultivo de CA, lo que adquiere especial importancia cuando se trata de simuladores de

doble compartimento. Éstos, como ya se mencionó en la sección 2.3.1.2, tienen el inconveniente de generar esfuerzos de corte en los cabezales de las bombas usadas para recirculación.

#### 2.4.1. Esfuerzos de corte y daños celulares letales

Cuando se encuentran en un fluido en movimiento, las células en cultivo experimentan *esfuerzos de corte* o cizalla [ $\tau$ , (N/m<sup>2</sup>)], que se definen como las fuerzas por unidad de área aplicadas en forma paralela a la superficie de una partícula (Trujillo-Roldán y Valdéz-Cruz, 2006). En comparación con las bacterias, las CA no tienen pared celular y son de mayor tamaño (alrededor de 15  $\mu$ m), lo que las hace más susceptibles al estrés hidrodinámico.

En un fluido newtoniano bajo régimen de flujo laminar<sup>9</sup>, la magnitud de  $\tau$  depende de la viscosidad dinámica [ $\eta$ , (N s/m<sup>2</sup>)] y el gradiente de deformación o de velocidad [ $\gamma = dv/dr$ , (1/s)] del fluido [ver sección 5.5.4.1, ecuación (5-29)] (Bird et al., 1960). La sensibilidad de algunas líneas celulares a los esfuerzos de corte en flujo laminar se ha evaluado en dispositivos que evitan la interferencia de la ruptura de burbujas y el efecto de las interfaces gas-líquido, como viscosímetros y tubos capilares (ver Tabla 2.2). En estos últimos se ha reportado daño celular a valores de  $\tau$  de 10 a 200 N/m<sup>2</sup>, en células de mamífero (HeLa S3 y L929) (Augenstein et al., 1971). En viscosímetros se ha observado que las células Sf9 de insecto pueden soportar  $\tau$  de sólo 0.59 N/m<sup>2</sup> ( $\gamma = 655.5$  s<sup>-1</sup>). Sin embargo, al agregar al medio agentes tensoactivos como el Pluronic F-68, esta línea celular puede tolerar esfuerzos de corte de hasta 4.51 N/m<sup>2</sup> ( $\gamma = 3000$  s<sup>-1</sup>) durante 15 min (Palomares et al., 2000). De forma similar, en hibridomas HB-32 de ratón cultivados en medios adicionados con colesterol, suero fetal bovino y Pluronic F-68, se ha reportado que pueden soportar  $\tau$  de hasta 7.2 N/m<sup>2</sup> ( $\gamma = 8000$  s<sup>-1</sup>) durante 20 min (Ramírez y Mutharasan, 1990b).

---

<sup>9</sup> En un biorreactor de tanque agitado el régimen de flujo se caracteriza por el *Número de Reynolds* [ $Re = ND^2\rho/\eta$ , adimensional, donde: N es la velocidad de agitación (1/s), D es el diámetro del impulsor (m),  $\rho$  es la densidad (kg/m<sup>3</sup>) y  $\eta$  es la viscosidad dinámica (Ns/m<sup>2</sup>)]. Cuando  $Re < 10$  el flujo es laminar, cuando  $10 < Re < 10\,000$  el flujo es de transición y cuando  $Re \geq 10\,000$  el flujo es turbulento.

**Tabla 2.2. Algunos reportes sobre esfuerzos de corte que producen lisis, en diferentes líneas celulares (adaptado de Garcia-Briones y Chalmers, 1994).**

| Tipo de célula  | $\tau$ (N/m <sup>2</sup> )           | Referencia                  |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Trabajos con flujo laminar en viscosímetros:</i>   |                                      |                             |
| Hibridoma   | 0.7                                  | Smith et al., 1987          |
| Hibridoma   | 15                                   | Schurch et al., 1988        |
| Hibridoma   | 5                                    | Petersen et al., 1988       |
| Hibridoma   | 86                                   | Abu-Reesh y Kargi, 1989     |
| Hibridoma   | 7.2                                  | Ramírez y Mutharasan, 1990b |
| Mieloma   | 200                                  | McQueen y Bailey, 1989      |
| Insecto   | 55                                   | Tramper et al., 1986        |
| Insecto   | 7.3                                  | Goldblum et al., 1990       |
| Insecto   | 13.1                                 | Goldblum et al., 1990       |
| Insecto   | 0.59 (sin PF-68)<br>4.51 (con PF-68) | Palomares et al., 2000      |
| <i>Trabajos con flujo turbulento en tubo capilar:</i> |                                      |                             |
| Cáncer  | 1000                                 | Boulton-Stone y Blake, 1993 |
| Mieloma   | 290                                  | McQueen et al., 1987        |
| Hibridoma   | 180                                  | McQueen y Bailey, 1989      |
| Hibridoma   | 563.2                                | Zhang et al., 1993          |
| Mieloma   | 208.9                                | Zhang et al., 1993          |

PF-68: Pluronic F-68.

#### **2.4.2. Teoría de Kolmogorov aplicada a tanques agitados: Microescala de torbellinos y esfuerzo de corte máximo**

En un biorreactor de tanque agitado cuyo flujo sea turbulento<sup>o</sup>, el perfil de  $\tau$  es hasta el momento difícil de predecir. El sistema de agitación genera grandes torbellinos primarios, cuyo tamaño es del mismo orden de magnitud que el diámetro del impulsor. Éstos se rompen por su inestabilidad, transfiriendo su energía cinética sucesivamente a torbellinos de menor escala o intermedios. La energía se disipa finalmente en forma de calor en los torbellinos más pequeños o terminales, debido a la viscosidad del fluido (Nielsen et al., 2003a, Trujillo-Roldán y Valdéz-Cruz, 2006).

Se considera que las células viajan en un movimiento convectivo en los torbellinos más grandes, sin ser dañadas. Sin embargo, los torbellinos de tamaño comparable al de las células pueden actuar sobre las mismas, sometiéndolas a esfuerzos

de corte que las afectan negativamente (Thomas, 1990). De acuerdo con el modelo de Kolmogorov (1941) para turbulencia isotrópica, los microtorbellinos tienen escalas características de longitud ( $\lambda_K$ , m) y velocidad ( $v_K$ , m/s) que dependen de la viscosidad cinemática ( $\nu$ , m<sup>2</sup>/s) y la energía de disipación promedio ( $\varepsilon$ , m<sup>2</sup>/s<sup>3</sup>) [ecuaciones (2-6) y (2-7)]. En tanques agitados,  $\varepsilon$  es igual al consumo de potencia ( $P$ , W o kg m<sup>2</sup>/s<sup>3</sup>) [ecuación (2-8)] por unidad de masa (kg), siendo de aproximadamente 0.01 W/kg para cultivos típicos de CA (Varley y Birch, 1999). Sin embargo, debido a la heterogeneidad en los biorreactores de gran escala, se considera que en la zona cercana al impulsor se encuentran los valores más altos de energía de disipación local ( $\varepsilon'$ ) y, por lo tanto, también el menor tamaño de los microtorbellinos ( $\lambda'_K$ ) [ecuaciones (2-9) y (2-10)] (Oh et al., 1989). Se ha observado que  $\varepsilon'$  puede alcanzar valores de 89.9 W/kg en tanques de 10 L, agitados a 700 rpm con una turbina Rushton; mientras que  $\varepsilon$  sólo alcanza los 0.652 W/kg (Zhou y Kresta, 1996). Así mismo, en tanques de 22 000 L agitados a 120 rpm con 4 turbinas Rushton,  $\varepsilon'$  fue de 94 W/kg mientras que  $\varepsilon$  sólo alcanzó los 2 W/kg (Wernersson y Tragardh, 1999). El esfuerzo de corte máximo ( $\tau_{m\acute{a}x}$ , N/m<sup>2</sup>) se puede estimar mediante la ecuación (2-11) (Cherry y Kwon, 1990).

$$\lambda_K = \left( \frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{0.25} \quad (2-6)$$

$$v_K = (\varepsilon \nu)^{0.25} \quad (2-7)$$

$$P = N_p \rho N^3 D^5 \quad (2-8)$$

donde

$N_p$  = número de potencia (adimensional),

$$\lambda'_K = \left( \frac{\nu^3}{\varepsilon'} \right)^{0.25} \quad (2-9)$$

$$\varepsilon' = 130\varepsilon \quad (2-10)$$

$$\tau_{m\acute{a}x} = 5.33 \rho \sqrt{\varepsilon \nu} \quad (2-11)$$

### 2.4.2.1. Estrés hidrodinámico letal en tanques agitados

En biorreactores de 1 L con impulsor de tipo hélice marina ( $D = 4$  cm), se ha observado que la muerte ocurre rápidamente en CI a partir de  $N = 9 \text{ s}^{-1}$  (540 rpm) (Tramper et al., 1996b). Bajo estas condiciones de operación se obtiene un régimen de flujo turbulento en el que, de acuerdo a las ecuaciones (2-6) a (2-11), tanto  $\lambda_K$  como  $\lambda'_K$  resultan ser del mismo orden de magnitud que el tamaño celular (Tabla 2.3). Esto sugiere que el daño letal a las células observado por Tramper et al., 1996b, probablemente fue causado por su interacción con los microtorbellinos. Además,

**Tabla 2.3. Estimación de la microescala de Kolmogorov y el esfuerzo de corte máximo, en algunas condiciones de cultivo reportadas para CA.**

| N<br>(rpm) | $\text{Re}$<br>( $\text{s}^{-1}$ ) | $N_P$               | $\epsilon$<br>(W / kg) | $\lambda_K^f$<br>( $\mu\text{m}$ ) | $\tau_{\text{máx}}^f$<br>( $\text{N} / \text{m}^2$ ) | $\lambda'_K{}^f$<br>( $\mu\text{m}$ ) | $\tau'_{\text{máx}}{}^f$<br>( $\text{N} / \text{m}^2$ ) | $Xv_{\text{máx}}$<br>(cél / mL) | $t_{CE}$<br>(h)   | Línea<br>celular | Referencia |   |
|------------|------------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|--|---------------------------------------|---|---------------------------------|-------------------|------------------|------------|---|
| 170        | 2.8                                | 5 287 <sup>a</sup>  | 0.36 <sup>c</sup>      | 0.0008 <sup>f</sup>                | 165.8  | 0.1                                   | 49.1  | 1.6                             | -                 | -                | -          | Condiciones recomendadas por O'Reilly et al., 1994. |
| 540        | 9                                  | 16 793 <sup>a</sup> | 0.35 <sup>c</sup>      | 0.0260 <sup>f</sup>                | 70.2   | 0.8                                   | 20.8  | 9.1                             | -                 | -                | Sf9        | Tramper et al., 1996b.                              |
| 60         | 1                                  | 3 739 <sup>b</sup>  | 4.1 <sup>c</sup>       | 0.0023 <sup>f</sup>                | 109.5  | 0.2                                   | 32.4  | 2.4                             | $2.4 \times 10^6$ | 96               | HB-32      | Ramírez y Mutharasan, 1990b.                        |
| 180        | 3                                  | 11 217 <sup>b</sup> | 5.1 <sup>c</sup>       | 0.0787 <sup>f</sup>                | 45.5   | 1.2                                   | 13.5  | 14.1                            | $1.1 \times 10^6$ | 72               | HB-32      | Ramírez y Mutharasan, 1990b.                        |
| 360        | 6                                  | 22 434 <sup>b</sup> | 5.1 <sup>c</sup>       | 0.6294 <sup>f</sup>                | 27.0   | 3.5                                   | 8.0   | 40.0                            | $0.2 \times 10^6$ | SC               | HB-32      | Ramírez y Mutharasan, 1990b.                        |
| 100        | 1.7                                | 8 625 <sup>c</sup>  | 0.4 <sup>g</sup>       | 0.0015 <sup>g</sup>                | 123.8  | 0.2                                   | 36.7  | 1.9                             | $9.3 \times 10^5$ | 24               | TB/C3      | Al-Rubeai et al., 1995                              |
| 600        | 10                                 | 51 750 <sup>c</sup> | 0.4 <sup>g</sup>       | 0.3221 <sup>g</sup>                | 32.3   | 2.5                                   | 9.6   | 28.0                            | $4.0 \times 10^5$ | SC               | TB/C3      | Al-Rubeai et al., 1995                              |
| 1 500      | 25                                 | 57 500 <sup>d</sup> | -                      | 1.8820 <sup>g</sup>                | 20.6   | 6.1                                   | 6.1   | 69.1                            | MC                | MC               | TB/C3      | Al-Rubeai et al., 1995                              |

(<sup>a</sup>) Turbina marina,  $D = 4.0$  cm; CI, 1.0 kg de medio;  $\rho_{27^\circ\text{C}} = 996.6 \text{ kg} / \text{m}^3$ ,  $\eta_{27^\circ\text{C}} = 8.546 \times 10^{-4} \text{ Ns} / \text{m}^2$ ,  $\nu_{27^\circ\text{C}} = 8.576 \times 10^{-7} \text{ m}^2 / \text{s}$ .

(<sup>b</sup>) Turbina Rushton,  $D = 5.1$  cm; Hibridomas, 0.6 kg de medio;  $\rho_{37^\circ\text{C}} = 993.6 \text{ kg} / \text{m}^3$ ,  $\eta_{37^\circ\text{C}} = 6.912 \times 10^{-4} \text{ Ns} / \text{m}^2$ ,  $\nu_{37^\circ\text{C}} = 6.956 \times 10^{-7} \text{ m}^2 / \text{s}$ . OD = constante.

(<sup>c</sup>) Turbina marina,  $D = 6$  cm; Hibridomas, 1.0 kg de medio;  $\rho_{37^\circ\text{C}} = 993.6 \text{ kg} / \text{m}^3$ ,  $\eta_{37^\circ\text{C}} = 6.912 \times 10^{-4} \text{ Ns} / \text{m}^2$ ,  $\nu_{37^\circ\text{C}} = 6.956 \times 10^{-7} \text{ m}^2 / \text{s}$ . OD constante a 50 % (respecto a la saturación con aire).

(<sup>d</sup>) Turbina de 4 paletas,  $D = 4$  cm; Hibridomas, agitados durante 7 h, 1.5 kg de medio;  $\rho_{37^\circ\text{C}} = 993.6 \text{ kg} / \text{m}^3$ ,  $\eta_{37^\circ\text{C}} = 6.912 \times 10^{-4} \text{ Ns} / \text{m}^2$ ,  $\nu_{37^\circ\text{C}} = 6.956 \times 10^{-7} \text{ m}^2 / \text{s}$ . Sin espacio gaseoso de cabeza ("gas headspace"), para evitar formación de burbujas.

(<sup>e</sup>) Datos tomados de Nielsen et al., 2003b y Bailey y Ollis, 1977.

(<sup>f</sup>) Valores estimados mediante las ecuaciones (2-6) a (2-11), de acuerdo a las condiciones de cultivo citadas en cada referencia.

(<sup>g</sup>) Valores citados en las referencias correspondientes.

(SC) Sin crecimiento.

(MC) Muerte celular.

aunque  $\tau_{\text{máx}}$  estuvo por debajo del valor mencionado anteriormente como tolerable por CI (Palomares et al., 2000), en las inmediaciones del impulsor ( $\tau'_{\text{máx}}$ ) las células estuvieron expuestas al doble del mismo valor crítico (Tabla 2.3).

Para evitar daños celulares, en cultivos de CA se recomienda que  $N$  no sobrepase los  $2.83 \text{ s}^{-1}$  (170 rpm, O'Reilly et al., 1994). Con esta agitación y bajo las demás condiciones de Tramper et al., 1996b, los valores de  $\tau_{\text{máx}}$  y  $\tau'_{\text{máx}}$  serían inferiores a los máximos reportados como tolerables por CA, así como  $\lambda_K$  estaría un orden de magnitud por arriba del tamaño celular. Sin embargo, los microtorbellinos en las inmediaciones del impulsor ( $\lambda'_K$ ) tendrían aún un tamaño suficiente para interactuar con las células (Tabla 2.3).

En cultivos de hibridomas TB/C3 se ha reportado un efecto letal similar al descrito anteriormente. Estas células no muestran daño aparente al agitar el cultivo con un impulsor de tipo propela, a 100 rpm. En cambio, al aumentar  $N$  a 600 rpm, cesó el crecimiento y disminuyó gradualmente la concentración de células viables; además, se observó muerte celular tanto por necrosis (lisis) como por apoptosis (muerte programada). La misma línea de hibridomas, al exponerse a 1 500 rpm con una turbina de cuatro paletas, disminuyó su concentración celular al 50 % después de 2 h, sin mostrar decremento en la viabilidad, indicando muerte necrótica. Posteriormente apareció una subpoblación de células de menor tamaño, en la que se detectó condensación del ADN y bajo contenido de actina, todos indicativos de muerte apoptótica (Al-Rubeai et al., 1995). En estas condiciones de agitación (600 y 1 500 rpm),  $\lambda_K$  y  $\lambda'_K$  tuvieron magnitudes similares al tamaño de las células, así como  $\tau'_{\text{máx}}$  alcanzó valores de hasta 3.9 y 9.6 veces lo tolerable por este tipo de células (Tabla 2.3).

Otras líneas celulares al parecer son menos sensibles a los esfuerzos de corte. Un ejemplo es el trabajo de Ramírez y Mutharasan, 1990b, en el que se evaluó el efecto de  $N$  en hibridomas HB-32 de ratón, cultivados en biorreactores de 0.6 L equipados con turbina Rushton. Al aumentar  $N$  de 60 a 180 rpm, observaron una disminución significativa tanto en el tiempo de crecimiento exponencial ( $t_{\text{CE}}$ ) como en la concentración celular viable máxima ( $X_{v_{\text{máx}}}$ ). Cuando  $N$  fue de 360 rpm no hubo crecimiento neto en el cultivo, aunque las células permanecieron viables por

aproximadamente 72 h (Tabla 2.3). De acuerdo con las ecuaciones (2-6) a (2-11), bajo estas condiciones de cultivo tanto  $\lambda_K$  como  $\lambda'_K$  disminuyeron al aumentar N, hasta ser del mismo orden de magnitud que el tamaño celular. Debido a esto, el daño no letal observado por Ramírez y Mutharasan, 1990b podría ser el resultado de la interacción de las células con los microtorbellinos. Además, aunque  $\tau_{\text{máx}}$  no fue mayor al reportado como tolerable por esta línea celular,  $\tau'_{\text{máx}}$  sí fue de 2 a 5.6 veces superior (Tabla 2.3).

#### 2.4.3. Otras causas de estrés hidrodinámico en biorreactores agitados

En un biorreactor se presentan además otras fuerzas, debido a la colisión de las células contra las paredes del biorreactor, el impulsor y otros objetos sumergidos. El burbujeo de gas al medio somete también a las CA a fuerzas mecánicas y de tensión superficial, resultantes del movimiento, separación y ruptura de las burbujas, además de la formación de espuma (Tramper et al., 1996b). Mediante simulaciones numéricas se ha calculado que una burbuja de 1.7 mm de diámetro, rompiéndose en la superficie de agua pura, puede liberar una cantidad de energía entre  $1.66 \times 10^4$  y  $4 \times 10^5$  W/kg, mientras que cuando el diámetro es de 6.32 mm, la energía liberada es de  $0.94 \times 10^2$  W/kg (Boulton-Stone y Blake, 1993; Garcia-Briones et al., 1994). Esto es, que para diámetros de burbuja de 0.77, 1.7 y 6.32 mm, el  $\tau_{\text{máx}}$  es de 479.7, 199.8 y  $17.5 \text{ N/m}^2$ , respectivamente (Garcia-Briones y Chalmers, 1994). En células de ovario de hámster chino (CHO, “*Chinese hamster ovary cells*”), hibridomas HB-24 de ratón, células de cáncer mamario humano MCF7 y células Sf9 de insecto, se ha reportado que pueden tolerar entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  W/kg durante fracciones de segundo, mientras que a mayor energía aplicada comienza la lisis celular significativa. Estos valores son comparables a la energía liberada por la ruptura de burbujas en la superficie del líquido (Ma et al., 2002).

#### 2.4.4. Daños subletales por estrés hidrodinámico

Como se ha descrito en los ejemplos anteriores, de acuerdo a las condiciones hidrodinámicas del cultivo y a la sensibilidad de la línea celular, se pueden presentar daños letales, que provocan la muerte celular por necrosis y/o apoptosis; o daños subletales, que se manifiestan como alteraciones metabólicas de las células (Prokop y Bajpai, 1992). Algunos ejemplos de efectos subletales se listan en la Tabla 2.4. En estos casos se presentan mecanismos de respuesta al estrés, mediante la recepción y

**Tabla 2.4. Efectos subletales observados en células animales, sometidas a esfuerzos de corte bien definidos en flujo laminar (tomado de Ma et al., 2002).**

| Línea Celular | Esfuerzo de corte (N/m <sup>2</sup> ) | Tiempo (h) | Efecto  | Referencia                |
|---------------|---------------------------------------|------------|---|---------------------------|
| BHK           | 26                                    | 1          | Pérdida de la adherencia                                      | Kretzmer y Schugerl, 1991 |
|               | 42                                    | 1          |   | Kretzmer y Schugerl, 1991 |
|               | 12                                    | 3 - 24     |   | Kretzmer y Schugerl, 1991 |
| BHK-21        | 4.5                                   |            | Incremento en el tiempo de expansión celular                  | Ludwig et al., 1992       |
| Leucocitos    | 15                                    |            | Alteración de la función celular                              | Dewitz et al., 1980       |
| Células T     | 10 - 20                               | 0.167      | Alteración de la función celular                              | Chittur et al., 1988      |
| Endoteliales  | 2.5                                   |            | Metabolismo del ácido araquidónico incrementado               | Nollert et al., 1991      |
| Endoteliales  | 2.5                                   |            | Cambios en la secreción del activador de plasminógeno tisular | Diamond et al., 1989      |
| Endoteliales  | 1.0                                   | 0.0167     | Activación de la proteína G                                   | Gudi et al., 1996         |
| HUVEC         | 2.5                                   | 1          | Inducción de la proteína c-fos                                | Ranjan et al., 1996       |
| BAEC          | 2.5                                   | 1          | Inducción de la proteína c-fos                                | Ranjan et al., 1996       |
| HeLa          | 2.5                                   | 1          | Inducción de la proteína c-fos                                | Ranjan et al., 1996       |
| CHO           | 2.5                                   | 1          | Inducción de la proteína c-fos                                | Ranjan et al., 1996       |

transducción de señales. Aquí se incluyen la deformación de las moléculas de la superficie celular (como canales iónicos), la detección por receptores específicos, el movimiento de los componentes celulares y los cambios en la fluidez de la membrana (Brakemeier et al., 2002). Éstos producen una serie de reacciones en cascada que afectan la síntesis de proteínas y ácidos ribonucleicos (ARN's) (Prokop y Bajpai, 1992; Joshi et al., 1996). Todo lo anterior se refleja en respuestas biológicas que pueden utilizarse como parámetros de cuantificación del daño celular, tales como: diferenciación, necrosis, apoptosis, velocidades de respiración, de crecimiento y de producción de diversos metabolitos (Trujillo-Roldán y Valdéz-Cruz, 2006).

En resumen...

Como se mencionó en la sección 2.3.1.2 para simuladores STR-STR, existen algunas dificultades técnicas que han impedido evaluar los efectos tanto del estrés hidrodinámico como de los gradientes de OD, bajo métodos de simulación basados en

el escalamiento descendente, en condiciones típicas de cultivo para CA. Resulta entonces necesario diseñar y evaluar otros sistemas en los que se pueda simular adecuadamente estas heterogeneidades ambientales, para estudiar su efecto en cultivos de CA.

Con base en lo anterior y bajo un esquema de escalamiento descendente, se presenta en este trabajo la evaluación de sistemas de doble compartimento de tipo STR-PFR (*“Stirred Tank Reactor - Plug Flow Reactor”*, Reactor de Tanque Agitado - Reactor de Flujo Tapón) y PFR-PFR, con recirculación en condiciones de bajo estrés hidrodinámico (flujo laminar), diseñados para simular gradientes de OD de 20 a 0 % y  $t_c$  menores a los 600 s, en cultivos de células animales.

---

---

### 3. HIPÓTESIS

El diseño y evaluación de sistemas de doble compartimento, STR-PFR y PFR-PFR, permitirá simular gradientes de oxígeno disuelto con tiempos de circulación similares a los esperados en cultivos de escala de producción, en condiciones de estrés hidrodinámico inferiores a las reportadas como letales y subletales para células animales.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo General

- Evaluar de forma teórica y experimental, sistemas de doble compartimento de escala laboratorio, diseñados para simular gradientes de oxígeno disuelto (OD) y tiempos de circulación ( $t_c$ ) similares a los encontrados en biorreactores de escala industrial para cultivos de células animales (CA).

#### 4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar en biorreactor instrumentado la tolerancia de las células de insecto (CI) a la recirculación mediante bomba peristáltica.
- Diseñar sistemas de doble compartimento [tanque agitado - tanque agitado (STR-STR), tanque agitado - flujo tapón (STR-PFR) y flujo tapón - flujo tapón (PFR-PFR)], con la capacidad de simular gradientes de OD de 20 a 0 %, con  $t_c$  entre 50 y 500 s, en condiciones de estrés hidrodinámico inferiores a las reportadas como letales para cultivos de hibridomas y CI.
- Evaluar el comportamiento de cultivos de CA en sistemas de doble compartimento.
- Determinar el efecto de esfuerzos de corte subletales sobre el crecimiento de CI, así como en la producción de proteína recombinante y su perfil de glicosilación.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron las líneas celulares listadas en la Tabla 5.1 para evaluar los simuladores de doble compartimento descritos en las secciones 5.3.2 y 5.3.3. Todos los experimentos se realizaron a partir del mismo lote de células congeladas y conservadas en N<sub>2</sub> líquido. El mantenimiento de estas líneas celulares se realizó en cultivos estáticos de células adheridas en frascos T (Corning) de 25 y 75 cm<sup>2</sup> (con 5 y 15 mL de medio, respectivamente), mediante pase de células (dilución 1:10) en fase exponencial, bajo las condiciones descritas en la Tabla 5.1. El número de pase se refiere a las veces que se ha subcultivado a las células. Para este trabajo, en todos los experimentos se utilizaron células con un número de pase menor a 30 a partir de la descongelación.

### 5.2. Baculovirus

El baculovirus recombinante es un derivado de AcNPV (*Autographa californica* nucleopoliedrovirus), al que se ha insertado el gen de la fosfatasa alcalina secretada

**Tabla 5.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo utilizadas para evaluar los simuladores de doble compartimento descritos en las secciones 5.3.2 y 5.3.3.**

| Línea Celular                  | Origen                                  | Condiciones de cultivo        |  |   |
|--------------------------------|---|-------------------------------|--|---|
|                                |   | Estático<br>(T-25 y T-75)     | Suspensión<br>(inóculos)                                   | Medio de Cultivo  |
| Tn-4h                          | Insecto:<br><i>Trichoplusia ni</i>      | 27 °C                         | 27 °C, 110 rpm<br>(spinner, 60 mL)                         | TNMFH <sup>a</sup><br>+ 10 % SFB <sup>b</sup> + 0.5 % PF-68 <sup>c</sup>              |
| BTI-Tn5B1-4<br>(High five, H5) | Insecto:<br><i>Trichoplusia ni</i>      | 27 °C                         | 27 °C, 110 rpm<br>(matraz, 30 mL)                          | SF900II SFM (Gibco)<br>+ 0.3 % PF-68 <sup>c</sup>                                     |
| CHO                            | Mamífero:<br>Ovario de<br>Hámster chino | 37 °C,<br>5 % CO <sub>2</sub> | 37 °C, 110 rpm,<br>5 % CO <sub>2</sub><br>(spinner, 60 mL) | IS-CHO (Irvine Scientific)<br>+ L-Gln 6.25 mM<br>+ metotrexato 1 x 10 <sup>-6</sup> M |

<sup>(a)</sup> Preparado con: Medio Grace (Gibco, para CI) + 0.35 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Sigma) + 3.33 g/L lactoalbúmina hidrolizada (Sigma) + 3.33 g/L extracto de levadura (Gibco) + 1 g/L glucosa (Sigma), pH 6.1 (ajustado con NaOH 1 N), esterilizado por filtración.

<sup>(b)</sup> SFB: Suero Fetal Bovino (Gibco).

<sup>(c)</sup> PF-68: Pluronic F-68 (Sigma), tensoactivo que protege a las células de los esfuerzos de corte.

(SeAP, “*Secreted Alkaline Phosphatase*”) bajo el control del promotor de la poliedrina.

El abasto viral se produjo por amplificación del baculovirus recombinante en células Sf9 (derivadas del insecto *Spodoptera frugiperda*) cultivadas en suspensión en frasco agitado “spinner”, a 110 rpm y 27 °C, en 200 mL de medio SF900II. Estas células fueron infectadas en la mitad de su fase exponencial de crecimiento, a una multiplicidad de infección (MDI<sup>10</sup>) de 0.1 ufp/célula, que es la recomendada para obtener títulos virales del orden de 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> ufp/mL (Radford et al., 1997). Se cosechó el baculovirus amplificado centrifugando el caldo de cultivo a 1000 rpm para remover los restos celulares, recuperando el virus en el sobrenadante y agregando 5 % de SFB para su almacenamiento a 4 °C, protegido de la luz. Previo a los experimentos, se tituló el abasto viral por el método descrito por Mena et al. (2003), el cual es una modificación del método de punto de dilución final o “*end-point dilution*” descrito por O’Reilly et al., 1994. El título del abasto viral producido para los experimentos de este trabajo fue de 2.49 x 10<sup>8</sup> ufp/mL.

### 5.3. Cultivos en biorreactor

Los inóculos para los cultivos en biorreactor se prepararon a partir de células en media fase exponencial, con viabilidad superior a 95 %, cultivadas en suspensión en frasco agitado “*spinner*”, que a su vez fueron inoculados con células tomadas en media fase exponencial de cultivos estáticos en Frasco T-75. En todos los experimentos en biorreactor, los cultivos se iniciaron con una concentración celular viable de 0.5 x 10<sup>6</sup> células/mL. En los cultivos infectados la adición del baculovirus se realizó a un TDI<sup>11</sup> de 1 x 10<sup>6</sup> células viables/mL, con una MDI de 10 ufp/célula viable.

#### 5.3.1. Evaluación de la resistencia celular a la recirculación

Para estas pruebas se utilizó la línea celular Tn-4h de insecto, cultivada en medio TNMFH en un biorreactor tipo tanque agitado (STR, “*Stirred Tank Reactor*”).

---

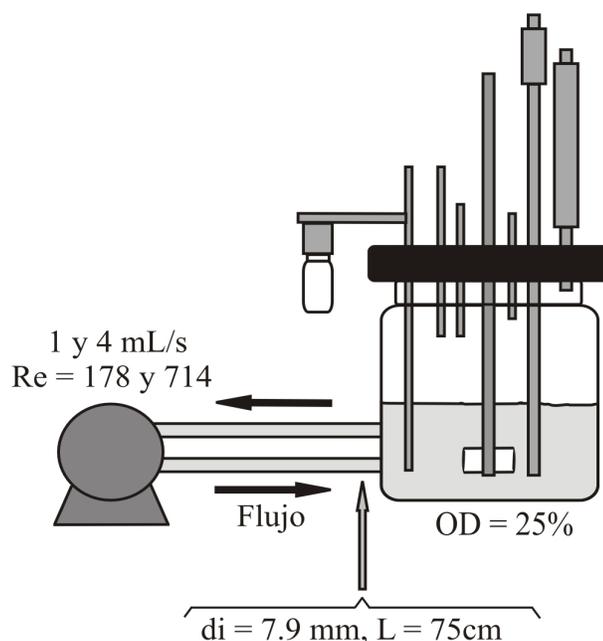
<sup>10</sup> La MDI (multiplicidad de infección) se define como el número de unidades formadoras de placa (ufp) de virus por cada célula en el cultivo, se estima que una unidad formadora de placa equivale a 500 partículas virales.

<sup>11</sup> El tiempo de infección (TDI) es en realidad la concentración celular a la cual se infecta el cultivo. El tiempo en que el cultivo alcanza esta concentración celular está en función de varios factores, entre los que se cuentan el inóculo, viabilidad, medio de cultivo, etc.

Utilizando un sistema computarizado de control y adquisición de datos, se controló el oxígeno disuelto (OD) a un nivel constante de 25 %, mediante aireación superficial a 27 °C y 120 rpm. Dos cultivos no infectados de 300 mL fueron realizados con recirculación del caldo de cultivo al mismo tanque, mediante una bomba peristáltica y una tubería de silicón (Masterflex 96400-18, diámetro interno de 7.9 mm) de 75 cm de largo, a flujos de 1 y 4 mL/s, que representan tiempos de circulación ( $t_c$ ) de 278 y 76 s, respectivamente. Esta configuración se denominó STR-loop (ver Figura 5.1). Para los cultivos control el sistema de recirculación fue retirado, quedando sólo el STR. Se realizaron además los correspondientes cultivos infectados con el baculovirus recombinante descrito en la sección 5.2, para evaluar la producción de proteína recombinante bajo las mismas condiciones de recirculación mencionadas anteriormente.

### 5.3.2. Simulador de doble compartimento STR/PFR

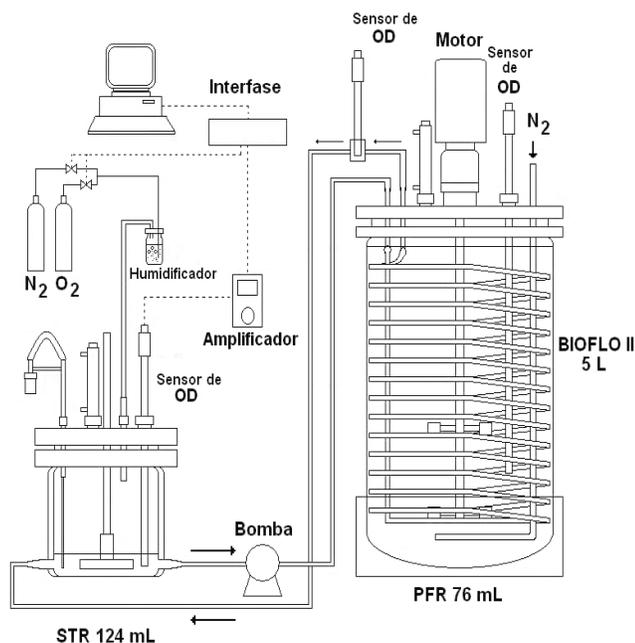
Este simulador (Figura 5.2) consiste en dos compartimentos interconectados: un biorreactor STR y uno tipo PFR (“*Plug Flow Reactor*”). El  $t_c$  es simulado al recircular el cultivo de 200 mL entre ambos compartimentos con una bomba peristáltica.



**Figura 5.1. Diagrama del sistema STR-loop (biorreactor recirculado con bombeo peristáltico).**

El compartimento STR consiste en un tanque de vidrio de 500 mL con chaqueta para control de temperatura y dos conectores laterales para recirculación del cultivo, situados próximos al fondo del tanque. Este biorreactor se encuentra instrumentado y conectado a un sistema de control y adquisición de datos que, mediante aireación superficial y manipulación de la composición de gases de entrada ( $O_2$  y  $N_2$ ), mantiene constante el OD a 20 %.

El compartimento PFR lo forma un serpentín de tubo flexible de silicón permeable a gases (Cole Parmer A-06411-62, 21 m de longitud, diámetros interno y externo de 1.6 y 3.2 mm, espesor de pared de 0.8 mm), sumergido en agua a 27 °C dentro del tanque de un biorreactor BioFlo 110 de 6 L (New Brunswick Scientific). El gradiente se logra manteniendo el OD a 0 % en el lado externo de la tubería, mediante burbujeo de  $N_2$  y agitación a 200 rpm. Esta diferencia de concentración entre los ambientes interno y externo del tubo promueve la desorción del oxígeno del cultivo en el interior del tubo hacia el exterior del mismo. En algunos cultivos el ambiente externo al tubo se mantuvo en 25 % de OD con el fin de obtener condiciones no limitantes y constantes de OD, que corresponderían a un reactor homogéneo.



**Figura 5.2. Diagrama del sistema STR/PFR para simular gradientes de OD.**

Para evaluar la resistencia de células animales a la recirculación en este sistema, a OD constante de 20 % en ambos compartimentos, se utilizaron las tres líneas celulares listadas en la Tabla 5.1.

### 5.3.3. Simulador de doble compartimento PFR/PFR

Este simulador (Figura 5.3) consiste de dos compartimentos PFR interconectados. La configuración de ambos compartimentos es idéntica a la ya descrita en la sección 5.3.2. El  $t_c$  es simulado al recircular el cultivo de 180 mL entre ambos compartimentos con una bomba peristáltica.

En el PFR de desorción de oxígeno, el gradiente de OD se obtiene de igual manera que en el sistema STR/PFR (ver sección 5.3.2). En el PFR de absorción de oxígeno, el gradiente de OD se consigue controlando el OD a 25 % en el ambiente externo, mediante burbujeo de una mezcla de aire/ $N_2$  y agitación a 200 rpm, con el fin de que la diferencia de concentración de OD promueva la absorción de oxígeno a través de la pared del tubo de silicón, con el consecuente aumento gradual del OD hasta 20 % en el cultivo circulando en su interior.

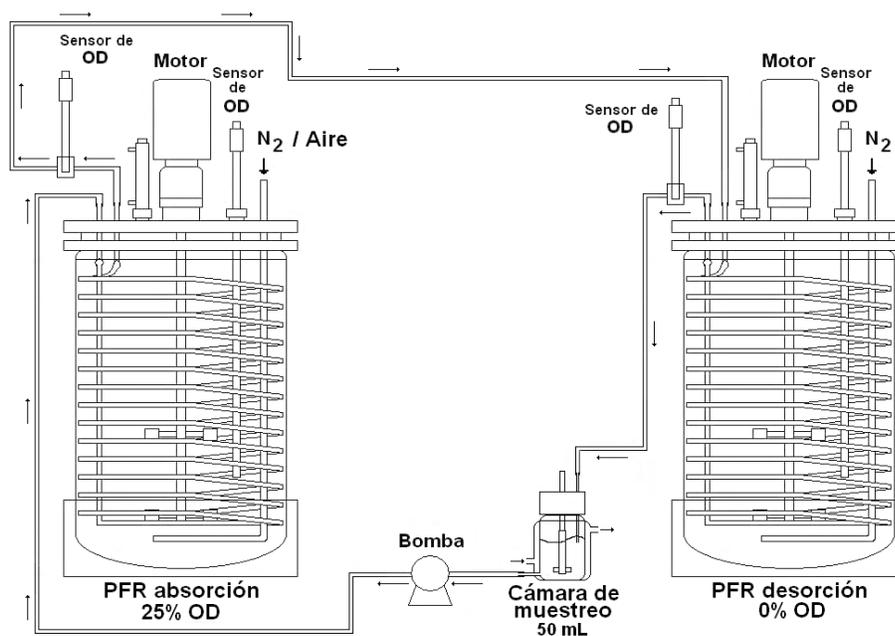


Figura 5.3. Diagrama del sistema PFR/PFR para simular gradientes de OD.

Para evaluar la resistencia celular a la recirculación en este sistema a OD constante de 20 % en ambos compartimentos, se utilizaron las líneas celulares de insecto listadas en la Tabla 5.1.

## 5.4. Métodos Analíticos

### 5.4.1. Determinación de la viabilidad celular

Se utilizó el método de tinción con azul de tripano y conteo celular al microscopio en hemocitómetro. El colorante penetra la membrana de las células no viables, que en consecuencia se tiñen de azul, lo que permite al ojo humano diferenciarlas claramente de las células viables (que no se tiñen). Se contaron 10 campos del hemocitómetro (de 20 a 50 células/campo), determinando la viabilidad celular “V (%)” según la ecuación (5-1).

$$V(\%) = \left( \frac{\text{células viables}}{\text{células totales}} \right) 100 \quad (5-1)$$

### 5.4.2. Determinación de la concentración celular total y viable

Se utilizó un contador de partículas Coulter Multisizer II (Coulter Electronics) para determinar el número total de células y la distribución de tamaños celulares de las muestras de cultivo. El principio es el siguiente: un volumen conocido de la suspensión celular es diluido en una solución salina isotónica, y de esta dilución un volumen determinado previamente (0.5 mL en este caso) es forzado a pasar por succión a través del orificio de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro de un tubo de vidrio. Al pasar por el orificio, las células interrumpen el flujo de la corriente existente entre dos electrodos, uno en el interior y otro en el exterior del tubo. Cada interrupción es registrada, dando por resultado un gráfico de distribución de tamaños de partícula y el número total de partículas contadas en el volumen succionado por el equipo. Las partículas que son más pequeñas que las células pueden ser descartadas del conteo al reducir el rango de registro del tamaño de partícula. En este trabajo se consideró un rango de 6 a 35  $\mu\text{m}$ . La concentración celular total en la muestra se determinó mediante la ecuación

$$X_T = \left( \frac{P}{V} \right) F_d \quad (5-2)$$

donde

- $X_T$  = concentración celular total en la muestra original (células/mL),  
 $P$  = número de partículas registradas por el Coulter Multisizer (células),  
 $V$  = volumen de muestra succionado por el Coulter Multisizer (mL),  
 $F_d$  = factor de dilución,

y la concentración celular viable se determinó de la siguiente manera:

$$X_v = X_T \left( \frac{V(\%)}{100} \right) \quad (5-3)$$

donde

- $X_v$  = concentración celular viable en la muestra original (células/mL),  
 $X_T$  = concentración celular total en la muestra original (células/mL).

#### 5.4.3. Análisis de metabolitos

Las concentraciones de glucosa y lactato se determinaron enzimáticamente utilizando un analizador bioquímico YSI modelo 2700 (Yellow Springs Instruments). El equipo cuenta con dos membranas en las que se encuentran inmovilizadas las enzimas glucosa oxidasa y L-lactato oxidasa, que catalizan la oxidación de la glucosa y el lactato para generar un derivado (D-glucono- $\delta$ -lactona y piruvato, respectivamente) y peróxido de hidrógeno, el cual es electroquímicamente oxidado en un ánodo de platino, generando un flujo de electrones que es linealmente proporcional a la concentración de peróxido y de sustrato. Este ánodo se encuentra protegido de otras sustancias oxidables por una cubierta de acetato de celulosa, que lo hace específico para peróxido de hidrógeno. Para calibrar el equipo se utilizaron soluciones estándar de D-(+)-glucosa 2.5 g/L y L-lactato 0.5 g/L. La reacción general ocurre de la siguiente manera:

Enzima-Sustrato



Peróxido-Ánodo de platino



#### 5.4.4. Análisis de la proteína recombinante

##### 5.4.4.1. Cuantificación

Se realizó por ensayo de la actividad enzimática a 37 °C, mediante la cinética de aparición del producto p-nitro fenol (PNP), como resultado de la hidrólisis del grupo fosfato del sustrato p-nitro fenil fosfato (PNPP), según la reacción



La concentración de PNP se relaciona linealmente con la absorbancia a 405 nm ( $A_{405 \text{ nm}}$ ), según el factor  $0.0576 \text{ mmol}_{\text{PNP}}/\text{L } A_{405 \text{ nm}}$ , que fue obtenido como la pendiente de la recta de regresión de una curva estándar de concentración de PNP (0.0030, 0.0040, 0.0060, 0.0067, 0.0075, 0.0086, 0.010, 0.012 y 0.015 mM) contra  $A_{405 \text{ nm}}$ , en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

Para cada ensayo se utilizó 1 mL de amortiguador de reacción (dietanolamina 1 M,  $\text{MgCl}_2$  0.5 mM, pH 9.8), 100  $\mu\text{L}$  de sustrato PNPP (120 mM) y 10  $\mu\text{L}$  de muestra (sobrenadante). Se registró la  $A_{405 \text{ nm}}$  a intervalos de 5 s durante 1 min. De la pendiente “a” de la recta de regresión que se obtuvo a partir de la relación lineal de la  $A_{405 \text{ nm}}$  contra el tiempo (min), la concentración “b” (UI/mL) de SeAP en el caldo de cultivo se determinó según se indica en las ecuaciones (5-7) y (5-8).

$$[\text{SeAP}] = \left( \begin{array}{c} \text{Pendiente} \\ \text{regresión} \\ \text{lineal} \end{array} \right) \left( \begin{array}{c} \text{Pendiente} \\ \text{de la curva} \\ \text{estándar de PNP} \end{array} \right) \left( \begin{array}{c} \text{Factor} \\ \text{de} \\ \text{conversión} \end{array} \right) \left( \begin{array}{c} \text{Volumen} \\ \text{de reacción} \\ \text{en la celda} \end{array} \right) \left( \begin{array}{c} \text{Volumen} \\ \text{de muestra} \end{array} \right) \quad (5-7)$$

$$\therefore [\text{SeAP}] = b \frac{\mu\text{mol}_{\text{PNP}}}{\text{mL min}}$$

Considerando que la aparición de PNP guarda una proporción mol a mol con la hidrólisis de PNPP (ver ecuación (5-6)), y que por definición 1 Unidad Internacional (UI) de fosfatasa alcalina es capaz de hidrolizar  $1.0 \mu\text{mol}_{\text{PNPP}}/\text{min}$ , a pH 9.8 y 37 °C, entonces:

$$[\text{SeAP}] = b \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \quad (5-8)$$

Para obtener la concentración de proteína recombinante en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se consideró que  $1 \mu\text{g}_{\text{SeAP}} = 0.730 \text{ UI}$  (Davis et al., 1992).

#### **5.4.4.2. Cosecha**

Al momento de la infección ( $\text{TDI} = 1 \times 10^6$  células viables/ $\text{mL}$ ) la viabilidad fue superior a 95 %. Se cosechó el caldo de cultivo cuando ésta disminuyó hasta 20 % como resultado del proceso de infección, removiendo células y demás restos celulares mediante centrifugación a 4 000 rpm, durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se almacenó en congelación a -20 °C para la posterior purificación de la proteína recombinante.

#### **5.4.4.3. Purificación**

Del sobrenadante descongelado se tomó una alícuota con 200  $\mu\text{g}$  de SeAP, la cual fue dializada en una membrana Spectra/por 2, realizando 12 cambios de amortiguador de diálisis (20 mM Tris, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8.0) a intervalos de 12 h. La muestra dializada se purificó por cromatografía de afinidad, utilizando la resina comercial ácido L histidil diazobenzil fosfónico-agarosa (Sigma). En todo momento se trabajó la columna a un flujo de 0.1 mL/min, estabilizándola durante 12 h con amortiguador de diálisis. Una vez cargada la muestra en la columna, se lavó nuevamente durante 12 h con amortiguador de diálisis, para retirar de la columna toda sustancia que no se haya asociado a la resina, y se realizó la elución de la proteína recombinante mediante un gradiente de fosfato de sodio de 1 a 100  $\mu\text{M}$ , recuperando un volumen total de elución de 200 mL. La proteína purificada se concentró por ultrafiltración hasta un volumen aproximado de 1.5 mL, utilizando tubos Centricon Plus-20 de 30 kDa y Centricon YM-10 de 10 kDa (Amicon).

Una vez cuantificada la SeAP contenida en el concentrado, se tomó una alícuota con 100  $\mu\text{g}$  de proteína (guardando el resto a -70 °C) para concentrarla nuevamente en un evaporador-concentrador Savant Speed Vac Plus SC110A, hasta un volumen de 32.5  $\mu\text{L}$ , que se almacenó en congelación a -70 °C para la posterior desglucosilación enzimática de la proteína recombinante.

#### 5.4.5. Análisis del patrón de glicosilación de SeAP

##### 5.4.5.1. Desglicosilación enzimática de SeAP

Para separar los glicanos de la proteína se utilizó la enzima PNGasa-F (*Chryseobacterium meningosepticum*, “*Peptide-N-Glycosidase F*”, Calbiochem), que cataliza la hidrólisis del enlace entre la asparagina y la cadena de oligosacáridos asociados a la glicoproteína. Para esto se utilizaron 100 µg de SeAP (concentrada en 32.5 mL), que fueron desnaturalizados por ebullición en baño de agua durante 5 min, con adición previa de 2.5 µL de una solución SDS 2 %, β-mercaptoetanol 1 M. Después de enfriar, a la proteína desnaturalizada se le agregó 5 µL de IGEPAL 630 al 7 %, 5 µL de amortiguador 10X (250 mM fosfato de sodio, pH 7.5), 4 µL de agua y 1 µL de PNGasa-F (1 UI/µL), incubando a 37 °C durante 15 h. Después de la incubación con PNGasa-F, se agregó como estándar interno 10 µL de una solución de maltosa 10 µM.

Los glicanos fueron purificados realizando una precipitación de la proteína, con 150 µL de etanol absoluto a -20 °C, dejando reposar 20 min (en refrigeración) y centrifugando posteriormente a 10 000 rpm durante 5 min. El sobrenadante recuperado (glicanos disueltos en etanol) se sometió a concentración mediante secado al vacío (en un Savant Speed Vac Plus SC110A), para eliminar el etanol y recuperar sólo los glicanos.

##### 5.4.5.2. Marcaje de oligosacáridos con 2-amino benzamida

Dada la naturaleza de los carbohidratos, su separación y detección por equipos cromatográficos o electroforéticos es complicada. La derivatización química de éstos compuestos es uno de los métodos utilizados para facilitar su detección por métodos espectroscópicos. Por esta razón, los glicanos recuperados fueron marcados mediante incubación a 65 °C por 2 h (en un termociclador PCRSprint, HYBAID) con 5 µL de la etiqueta fluorescente 2-amino benzamida (2-AB, Prozyme), que se une de manera covalente, en una relación mol a mol, al único extremo reductor del oligosacárido, donde antes se encontraba el enlace covalente con la asparagina de la glicoproteína.

Los oligosacáridos marcados (2-AB-glicanos) fueron purificados después de la incubación para eliminar el exceso del marcador. Esta purificación se llevó a cabo por adsorción y elución de los 2-AB-glicanos en discos de papel filtro Watman No. 1, de

13 mm de diámetro, colocados en cartuchos cilíndricos de vidrio. El papel filtro fue tratado previamente mediante cuatro lavados por inmersión en agua MQ, realizando cambios de agua cada 15 min, secando posteriormente en horno a 65 °C durante 2 h. La adsorción se realizó preparando previamente el cartucho, mediante un lavado con 1 mL de agua, 5 mL de ácido acético 30 % y 1 mL de acetonitrilo 100 %, haciendo pasar, por gravedad, volúmenes sucesivos de 1 mL a través del papel filtro. Hecho esto, se depositó entonces la muestra de 2-AB-glicanos en el cartucho (recuperando después los residuos de oligosacáridos del tubo que contenía la muestra, con 115 µL de acetonitrilo 100 %, para minimizar la pérdida por manipulación), dejando reposar durante 15 min para una adecuada adsorción de los oligosacáridos marcados en el papel filtro. Finalmente, se lavó de nuevo el cartucho con 1 mL de acetonitrilo 100 %, seguido de 5 mL de acetonitrilo 96 %, en volúmenes sucesivos de 1 mL. La elución se realizó haciendo pasar por gravedad 2 mL de agua MQ en volúmenes sucesivos de 0.5 mL, que fueron concentrados mediante secado al vacío y redisueltos en 100 µL de agua, para dar una concentración final de (2-AB-glicanos provenientes de 1 µg SeAP)/µL. Éstos fueron almacenados a -70 °C para su posterior análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, “*High Performance Liquid Chromatography*”).

#### 5.4.5.3. Digestión enzimática de 2-AB glicanos con exoglicosidasas

Se utilizaron las siguientes cantidades de exoglicosidasas por muestra (todos los números de catálogo son de Glyko):

- |  |                                 |
|--|---------------------------------|
| • $\alpha$ -Manosidasa (Jack bean, X-5010)               | 3 µL por reacción <sup>12</sup> |
| • Fucosidasa (riñón de bovino, X-5006)                   | 1 µL por reacción <sup>13</sup> |
| • Galactosidasa (testículo de bovino, X-5013)            | 1 µL por reacción <sup>14</sup> |
| • Sialidasa I ( <i>Clostridium perfringens</i> , X-5021) | 1 µL por reacción <sup>15</sup> |

<sup>12</sup> Fue reconstituida con 25 µL de buffer de reacción.

<sup>13</sup> Fue reconstituida con 25 µL de buffer de reacción.

<sup>14</sup> Previa dilución 1:4, 1 µL de enzima + 3 µL de agua MQ.

<sup>15</sup> Previa dilución 1:4, 1 µL de enzima + 3 µL de agua MQ.

Para la manosidasa se utilizó el amortiguador 5X que proporciona el fabricante. Para todas las demás enzimas se utilizó un amortiguador 5X de acetato de sodio 250 mM, pH 5. En todas las digestiones realizadas se tomaron alícuotas de 3.2  $\mu$ L de 2-AB-glicanos, 3  $\mu$ L del correspondiente amortiguador de reacción 5X, y se agregó el volumen necesario de la enzima, completando el volumen de reacción a 15  $\mu$ L con agua MQ, para una concentración final del amortiguador de reacción equivalente a 1X. Se incubó la mezcla de reacción a 37 °C durante 18 h y se almacenaron los tubos en refrigeración.

Las muestras de glicanos digeridos con exoglicosidasas se purificaron por precipitación de la proteína con 45  $\mu$ L de etanol absoluto a -20 °C, reposo durante 20 min en refrigeración y centrifugado a 10 000 rpm por 5 min. El sobrenadante recuperado (glicanos digeridos disueltos en etanol) se sometió a concentración mediante secado al vacío, para eliminar el etanol y recuperar sólo los glicanos digeridos, que fueron redisueltos en 10  $\mu$ L de agua y almacenados en congelación a -70 °C, para su posterior análisis por HPLC.

#### **5.4.5.4. Separación de glicanos por HPLC**

Se realizó la separación de glicanos por HPLC en una columna GlycoSep-N (4.6 mm x 250 mm), que es capaz de separar tanto glicanos neutros como glicanos cargados con base en su hidrofobicidad. Se utilizó una fase móvil compuesta por un gradiente de acetonitrilo y formato de amonio (25 o 250 mM, pH 4.4) durante 180 min a 30 °C. Un detector de fluorescencia Waters 2475 fue empleado para registrar el tiempo de migración y la cantidad de los diferentes glicanos en la muestra, utilizando una longitud de onda de excitación de 330 nm y midiendo la emisión a 420 nm.

Se calibró la columna utilizando una escalera estándar de homopolímeros de glucosa (Glyco) marcados con 2-AB. La escalera de glucosa es una serie de polímeros resultantes de digestiones parciales de dextrán, que son retenidos en la columna de acuerdo al número de unidades monoméricas de glucosa presentes en cada polímero. Del cromatograma resultante se obtiene una serie de picos a los que se puede asignar un valor de unidades de glucosa (UG) correspondiente a su tiempo de retención. A la relación de UG contra tiempo de retención puede ajustarse una ecuación polinomial de tercer orden, con la que los tiempos de retención de cada pico de las muestras de

2-AB-glicanos se pueden representar como retención en UG. Con apoyo en la literatura (Takahashi y Tomiya, 1992; Guile et al., 1996; Joshi et al., 2000; y Joshi et al., 2001), la asignación de estructuras para cada pico se realizó con base en su tiempo de retención expresado como UG, y a su sensibilidad total o parcial a la digestión con exoglicosidasas (ver sección 5.4.5.3), determinada como la desaparición o la disminución, respectivamente, en el área del pico en la muestra digerida con respecto al mismo pico en el cromatograma de la muestra original.

## 5.5. Consideraciones matemáticas

### 5.5.1. Determinación de parámetros cinéticos de cultivo

#### 5.5.1.1. Velocidad específica de crecimiento

Tanto en los cultivos de células de mamífero, como en los cultivos no infectados de CI, la velocidad específica aparente de crecimiento ( $\mu_{ap}$ ,  $h^{-1}$ ) se determinó aplicando el modelo de crecimiento exponencial, en el que

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu_{ap} X_v \quad (5-9)$$

donde

$t$  = tiempo (h), y

$\mu_{ap}$  = velocidad específica aparente de crecimiento ( $h^{-1}$ ).

Considerando que la  $\mu_{ap}$  es constante durante la fase de crecimiento exponencial, de la integración de la ecuación (5-9) se obtiene

$$\ln\left(\frac{X_v}{X_{v_0}}\right) = \mu_{ap} t \quad (5-10)$$

en donde  $X_{v_0}$  es la concentración de células viables en el tiempo  $t = 0$ . Así, la  $\mu_{ap}$ , que de aquí en adelante se indicará en el texto sólo como *velocidad específica de crecimiento*,  $\mu$  ( $h^{-1}$ ), se determinó según la ecuación (5-10), como la pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de la relación lineal de  $\ln(X_v/X_{v_0})$  contra el tiempo (h).

En el caso de CI infectadas, la velocidad específica de crecimiento no se mantiene constante a lo largo del cultivo, sino que experimenta una desaceleración debida a la infección con el baculovirus recombinante. Debido a esto, las cinéticas

típicas de cultivos infectados no muestran un perfil exponencial como el observado en cultivos no infectados, por lo que no es posible la aplicación de este modelo [ecuación (5-9)].

#### 5.5.1.2. Velocidad específica de producción de proteína recombinante

Se utilizó el modelo propuesto por Leudeking y Piret (1959), en el que la velocidad de producción del producto deseado es función de si éste está asociado o no al crecimiento celular. Este modelo obedece a la ecuación

$$\frac{dP}{dt} = (\alpha\mu + \beta)Xv \quad (5-11)$$

donde

$dP/dt$  = velocidad volumétrica de producción de proteína ( $\mu\text{g}_{\text{SeAP}}/\text{mL h}$ ),

$P$  = concentración de proteína recombinante ( $\mu\text{g}_{\text{SeAP}}/\text{mL}$ ),

$\alpha$  = constante estequiométrica ( $\mu\text{g}_{\text{SeAP}}/\text{célula}$ ), y

$\beta$  = constante cinética ( $\mu\text{g}_{\text{SeAP}}/\text{célula h}$ ).

Para aplicar este modelo al sistema de CI-BV fue necesario considerar el comportamiento de la población celular, así como la generación de proteína recombinante. Como se mencionó anteriormente, en los cultivos infectados presentados en este trabajo no se observó crecimiento celular en el periodo de tiempo postinfección, por lo que el término  $\alpha\mu = 0$  y la ecuación (5-11) se reduce a

$$\frac{dP}{dt} = \beta Xv \quad (5-12)$$

en la que  $\beta$  es una constante de producción de SeAP no asociada al crecimiento, que es equivalente a la *velocidad específica de producción de proteína recombinante*,  $q_{\text{SeAP}}$  ( $\mu\text{g}/\text{célula h}$ ). Integrando la ecuación (5-12) se obtiene

$$P - P_0 = \beta \int_0^t Xv dt \quad (5-13)$$

donde  $P_0$  y  $P$  son la concentración de SeAP a los tiempos  $t = 0$  y  $t = t$ , respectivamente.

El término  $\int_0^t X_v dt$ , que se conoce como “índice de viabilidad” ( $I_v$ , células h/mL), se puede calcular como el área bajo la curva de  $X_v$  (células/mL) contra el tiempo (h) (Luan et al., 1987; Ramírez y Mutharasan, 1990a; Yamaji et al., 1999), utilizando el método por trapecios para integración definida aproximada<sup>16</sup>. De esta manera, el coeficiente  $\beta$  de la ecuación (5-13), o sea  $q_{\text{SeAP}}$ , se puede calcular como la pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de la relación lineal de  $(P - P_0)$  contra  $I_v$ .

### 5.5.1.3. Velocidad específica de producción de lactato

Tanto en la etapa preinfección como en la postinfección, la producción de lactato se determinó según el siguiente modelo:

$$\frac{dM}{dt} = q_{\text{Lac}} X_v \quad (5-14)$$

donde

$dM/dt$  = velocidad volumétrica de producción del metabolito ( $\mu\text{mol}_{\text{Lac}}/\text{mL h}$ ),

$M$  = concentración del metabolito producido ( $\mu\text{mol}_{\text{Lac}}/\text{mL}$ ), y

$q_{\text{Lac}}$  = velocidad específica de producción de lactato ( $\mu\text{mol}_{\text{Lac}}/\text{célula h}$ ).

Considerando que  $q_{\text{Lac}}$  es constante, de la integración de la ecuación (5-14) se obtiene

$$M - M_0 = q_{\text{Lac}} \int_0^t X_v dt \quad (5-15)$$

donde  $M_0$  y  $M$  son la concentración de lactato a los tiempos  $t = 0$  y  $t = t$ , respectivamente, y el término  $\int_0^t X_v dt$  es el índice de viabilidad ( $I_v$ ) ya mencionado en

<sup>16</sup> El procedimiento es el siguiente:

1. *Calcular la suma de las bases de cada trapecio, y dividir entre 2:* Esto es el promedio de la concentración de células viables de la cinética a cada intervalo de tiempo (células/mL).
2. *Calcular la altura de cada trapecio:* Esto es, el intervalo de tiempo entre muestras (h).
3. *Calcular el área de cada trapecio como el producto de cada par de datos de los puntos 1 y 2:* Esto es el índice de viabilidad que corresponde a cada intervalo de muestreo (células h/mL).
4. Con esto se puede obtener el índice de viabilidad ( $I_v$ ) a cada tiempo  $t = t$ , que corresponderá al valor acumulado de las áreas de todos los trapecios desde  $t = 0$  hasta  $t = t$ , es decir, al valor de  $\int_0^t X_v dt$ .

la sección 5.5.1.2. Así,  $q_{Lac}$  se calculó según la ecuación (5-15), como la pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de la relación lineal de  $(M - M_0)$  contra  $I_V$ .

#### 5.5.1.4. Velocidad específica de consumo de glucosa

Tanto en la etapa preinfección como en la postinfección el consumo de glucosa se determinó según el modelo:

$$-\frac{dS}{dt} = q_{Glc} X_V \quad (5-16)$$

donde

$-dS/dt$  = velocidad volumétrica de consumo de sustrato ( $\mu\text{mol}_{Glc}/\text{mL h}$ ),

$S$  = concentración del sustrato consumido ( $\mu\text{mol}_{Glc}/\text{mL}$ ), y

$q_{Glc}$  = velocidad específica de consumo de glucosa ( $\mu\text{mol}_{Glc}/\text{célula h}$ ).

Considerando que  $q_{Glc}$  es constante, de la integración de la ecuación (5-16) se obtiene

$$S_0 - S = q_{Glc} \int_0^t X_V dt \quad (5-17)$$

en donde  $S_0$  y  $S$  son la concentración de glucosa a los tiempos  $t=0$  y  $t=t$ ,

respectivamente, y el término  $\int_0^t X_V dt$  es el índice de viabilidad ( $I_V$ ) mencionado en la

sección 5.5.1.2. De esta manera,  $q_{Glc}$  se calculó según la ecuación (5-17), como la pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de la relación lineal de  $(S_0 - S)$  contra  $I_V$ .

### 5.5.2. Determinación de parámetros estequiométricos de cultivo

#### 5.5.2.1. Rendimientos

Tanto para la etapa preinfección como para la postinfección, los rendimientos de producción de proteína recombinante, de lactato y de biomasa, todos con respecto al consumo de glucosa ( $Y_{SeAP/Glc}$ ,  $Y_{Lac/Glc}$ ,  $Y_{XV/Glc}$ , respectivamente) fueron determinados según se indica en las ecuaciones (5-18), (5-19) y (5-20):

$$Y_{\text{SeAP/Glc}} = \frac{q_{\text{SeAP}}}{q_{\text{Glc}}} [=] \frac{\left( \frac{\mu\text{g}_{\text{SeAP}}}{\text{célula h}} \right)}{\left( \frac{\mu\text{mol}_{\text{Glc}}}{\text{célula h}} \right)} [=] \frac{\text{g}_{\text{SeAP}}}{\text{mol}_{\text{Glc}}} \quad (5-18)$$

$$Y_{\text{Lac/Glc}} = \frac{q_{\text{Lac}}}{q_{\text{Glc}}} [=] \frac{\left( \frac{\mu\text{mol}_{\text{Lac}}}{\text{célula h}} \right)}{\left( \frac{\mu\text{mol}_{\text{Glc}}}{\text{célula h}} \right)} [=] \frac{\text{mol}_{\text{Lac}}}{\text{mol}_{\text{Glc}}} \quad (5-19)$$

$$Y_{\text{Xv/Glc}} = \frac{\mu}{q_{\text{Glc}}} [=] \frac{\left( \frac{1}{\text{h}} \right)}{\left( \frac{\mu\text{mol}_{\text{Glc}}}{\text{célula h}} \right)} [=] \frac{\text{células}}{\mu\text{mol}_{\text{Glc}}} \quad (5-20)$$

### 5.5.3. Modelamiento del perfil de OD en el compartimento PFR

La Figura 5.4 es un esquema del compartimento PFR de desorción de los biorreactores mostrados tanto en la Figura 5.2 como en la Figura 5.3. El perfil de OD en este compartimento se caracterizó mediante un balance de masa para oxígeno, realizado en un elemento discreto diferencial del fluido en el interior del tubo. Este elemento está representado en la Figura 5.4 como un segmento cilíndrico de longitud “dz” (cm) y diámetro interno “d<sub>i</sub>” (cm), que se traslada por la longitud axial “z” (cm) del tubo a una velocidad determinada según el flujo, sin presentar intercambio de materia con los elementos diferenciales adyacentes, condición necesaria para considerarlo como flujo tapón (régimen turbulento)<sup>17</sup>. En dicho segmento, “A” (cm<sup>2</sup>) corresponde al área de transferencia de oxígeno a través de la pared, “C<sub>L(int)</sub>” (mg/cm<sup>3</sup>) es la concentración de OD en el cultivo fluyendo en el interior, que disminuye con el tiempo transcurrido según sea el avance del elemento diferencial en la posición “z”, y “C<sub>L(ext)</sub>” (mg/cm<sup>3</sup>) es la concentración de OD en el ambiente externo, que se mantiene en 0 % mediante burbujeo de N<sub>2</sub>.

<sup>17</sup> En este trabajo se evaluaron flujos menores a 1 mL/s, que para las dimensiones del tubo generan flujos de tipo laminar (Re < 2000). Aún así, fue posible predecir exitosamente los perfiles de OD obtenidos experimentalmente.



25), en el balance de masa de la ecuación (5-22), se obtiene que

$$\frac{dC_{L(int)}}{dt} = -k_L a [C_{L(int)} - C_{L(ext)}] - q_{O_2} Xv \quad (5-26)$$

y como el área interfacial “a” se puede expresar como

$$a = \frac{A}{V_s} = \frac{\pi d_i dz}{V_s} \quad (5-27)$$

entonces el balance de masa en el elemento diferencial puede representarse como

$$\frac{dC_{L(int)}}{dt} = -k_L \left( \frac{\pi d_i dz}{V_s} \right) [C_{L(int)} - C_{L(ext)}] - q_{O_2} Xv \quad (5-28)$$

#### 5.5.4. Modelamiento de los esfuerzos de corte en el compartimento PFR

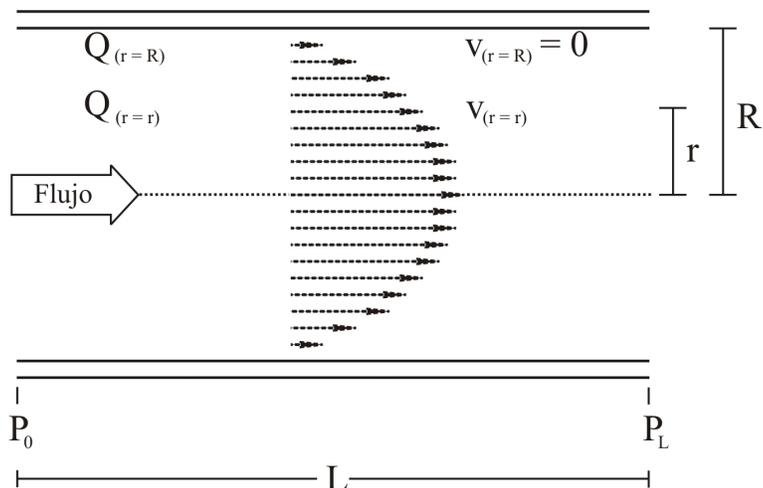
##### 5.5.4.1. Perfil parabólico de velocidad

Todos los flujos de recirculación evaluados en los compartimentos tipo PFR fueron menores a 1 mL/s, generándose flujos de tipo laminar ( $Re < 2000$ ), de acuerdo a las dimensiones del tubo y a las características físicas del fluido. La ecuación para determinar el perfil de velocidad se puede obtener a partir de la ley de la viscosidad de Newton, considerando que se trata de un fluido que circula en régimen laminar por una tubería cilíndrica (ver Figura 5.5) de radio interior “R” (cm) y longitud “L” (cm), bajo la acción de una fuerza “F” ( $kg\ cm/s^2$ ) producida por la diferencia de presión “(P<sub>0</sub> - P<sub>L</sub>)” [ $(kg\ cm/s^2)/cm^2$ ] existente entre los extremos del tubo. De esta manera, se puede deducir que

$$\tau = \frac{F}{A} = \frac{(P_0 - P_L) \pi r^2}{2 \pi r L} = -\eta \frac{dv}{dr} \quad (5-29)$$

en donde el signo negativo que antecede a la viscosidad dinámica “η” ( $kg/cm\ s$ ) se debe a que la velocidad “v” ( $cm/s$ ) disminuye con el incremento del radio “r” (cm) (ver Figura 5.5), siendo “τ” ( $kg/cm\ s^2$ ) el esfuerzo cortante y “A” ( $cm^2$ ) el área lateral del cilindro de radio = r. Rearreglando la ecuación (5-29) se obtiene que

$$-\int_v^0 dv = \frac{(P_0 - P_L)}{2 \eta L} \int_r^R r dr \quad (5-30)$$



**Figura 5.5. Esquema del perfil parabólico de velocidad de un flujo laminar en una tubería cilíndrica.**

de cuya integración resulta que cuando el radio es “r”, la velocidad “v” equivale a

$$v_{(r=r)} = \frac{(P_0 - P_L) R^2}{4 \eta L} \left( 1 - \frac{r^2}{R^2} \right) \quad (5-31)$$

que representa a la ley de Poiseuille para flujo laminar en tuberías cilíndricas (Bird et al., 1960), de donde se puede observar que la velocidad del líquido guarda una dependencia parabólica con respecto al radio “r”, como se muestra en la Figura 5.5.

El flujo volumétrico cuando  $r = R$  se puede obtener mediante la integración de la distribución de velocidad a través de una sección transversal, según la ecuación (5-32) (Bird et al., 1960):

$$Q_{(r=R)} = \int_0^{2\pi} \int_0^R v_{(r=r)} r \, dr \, d\theta \quad (5-32)$$

en la que sustituyendo la ecuación (5-31), e integrando, se obtiene la relación

$$Q_{(r=R)} = \frac{\Delta P R^4 \pi}{8 \eta L} \quad (5-33)$$

que se conoce como la forma integrada de la Ley de Poiseuille, de donde se puede determinar la caída de presión en función del flujo volumétrico.

### 5.5.4.2. Perfil de esfuerzos de corte

De la ecuación (5-29) se puede ver que

$$\tau_{(r=r)} = \frac{\Delta P r}{2L} \quad (5-34)$$

de donde es posible calcular el perfil de esfuerzos de corte “ $\tau$ ” en función del radio “ $r$ ”, para la caída de presión “ $(P_0 - P_L)$ ” estimada mediante la ecuación (5-33), correspondiente a cada flujo “ $Q_{(r=R)}$ ”.

### 5.5.4.3. Esfuerzo de corte máximo

El esfuerzo de corte máximo “ $\tau_w$ ” se presenta en la proximidad de la pared del tubo, donde la velocidad del fluido es cercana a cero, y se puede expresar de acuerdo con la ecuación (5-34) como

$$\tau_w = \tau_{(r=R)} = \frac{\Delta P R}{2L} \quad (5-35)$$

así, sustituyendo la ecuación (5-35) en la forma integrada de la ley de Poiseuille [ecuación (5-33)], se obtiene que

$$\tau_w = \frac{4\eta Q_{(r=R)}}{\pi R^3} \quad (5-36)$$

de donde, para un fluido determinado circulando en una tubería de radio “ $R$ ”, se puede determinar “ $\tau_w$ ” en función de la magnitud del flujo volumétrico “ $Q$ ”.

---

---

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para facilitar la comprensión de este capítulo, los resultados se presentan en tres partes. En la sección 6.1 se muestra la amplitud de los gradientes de OD obtenidos en sistemas de doble compartimento recirculados, así como la estimación del perfil de los mismos mediante un modelo matemático. En la sección 6.2 se evalúa el comportamiento de cultivos de CA en dichos sistemas, con OD constante. Por último, en la sección 6.3 se presenta el impacto de esfuerzos de corte subletales sobre el crecimiento de CA, así como en la producción de PR y su perfil de glicosilación.

### 6.1. Evaluación del perfil de gradientes de OD y esfuerzos de corte en sistemas de doble compartimento

Entre las CA, las CI en general son las que tienen más altas demandas de oxígeno. Se ha observado que las constantes de saturación de oxígeno [ $K_{O_2}$  de Monod, ecuación (6-1)] para el crecimiento celular, tanto de cultivos no infectados como infectados, pueden estar entre 1.91 y 5 %, respectivamente. Debido a esto, concentraciones de OD menores a 20 % pueden limitar el crecimiento y la producción de PR (Zhang et al., 1994; Arroniz, 2003; Palomares y Ramírez, 1996). Por lo tanto, es necesario que el sistema de doble compartimento sea capaz de simular, por lo menos, gradientes de OD de 20 a 0 %, con tiempos de circulación en el intervalo  $50 < t_c, s < 500$ , que son los que se esperan en cultivos de escala industrial (Palomares y Ramírez, 2000a; Palomares y Ramírez, 2000b).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} OD}{K_{O_2} + OD} \quad (6-1)$$

donde:

$\mu_{\max}$  = velocidad específica máxima de crecimiento,

$K_{O_2}$  = constante de saturación para oxígeno disuelto,

#### 6.1.1. Sistema de doble compartimento STR/STR

Este tipo de sistema se evaluó utilizando dos tanques interconectados como en la Figura 2.4, en condiciones de cultivo típicas para CA (agitación < 170 rpm, volumen < 400 mL, aireación superficial < 600 mL/min), controlados a 20 % de OD

con mezcla de gases  $O_2$  y  $N_2$  previo a la recirculación. Simultáneamente, en el tanque designado como compartimento limitante de OD se modificó el gas de entrada por  $N_2$  puro, se fijó el control a 20 % de OD en el compartimento no limitante y se inició la recirculación del medio entre ambos (flujos entre 1 y 4 mL/s). Esto provocó un incremento gradual en el OD en los dos tanques hasta la saturación (datos no presentados), por lo que con estas condiciones no fue posible simular gradientes de OD. El aumento en el OD hasta 100 % indicó una entrada de oxígeno al sistema, filtrándose a través de la pared permeable del tubo flexible de silicón utilizado en el cabezal de las bombas que recirculan el medio entre los compartimentos. Esta importante filtración de oxígeno no pudo evitarse aún cambiando el material del tubo en el cabezal por otros menos permeables.

Bajo las condiciones de operación anteriores, los tanques de este sistema alcanzaron valores de  $k_La$  entre 1.6 y 2.7  $h^{-1}$ . De acuerdo con la solución numérica del balance de masa para oxígeno [ecuaciones (2-4) y (2-5)] en este tipo de sistemas [Figura 2.4], en un medio acuoso sin células esta capacidad de transferencia de masa no sería suficiente para simular gradientes de OD similares a los esperados en cultivos de CA, incluso asumiendo valores de  $k_La$  superiores a los observados (Tabla 6.1).

El consumo de oxígeno por células de mamífero e insecto al parecer contribuiría de manera más importante en la generación de gradientes. Sólo considerando valores de  $k_La$  entre 4 y 6  $h^{-1}$  e incluyendo el consumo de oxígeno por CI H5 y Tn-4h infectadas, sería posible la simulación de gradientes de OD de 20 a 0 % en cultivos con  $t_c$  de 500 s, que es aún el doble que el mayor  $t_c$  esperado en escalas de producción (Tabla 6.1). Debido a esto, en el presente trabajo se decidió utilizar configuraciones basadas en biorreactores tubulares, de tipo PFR.

### 6.1.2. Sistema de doble compartimento STR/PFR

En este diseño (Figura 5.2), descrito en la sección 5.3.2, el tubo de silicón permeable a gases que se utilizó para el compartimento PFR ofreció poca resistencia a la presión del flujo, el cual no pudo ser superior a 1 mL/s. Por lo tanto, en este simulador se evaluaron flujos de 0.32, 0.51 y 0.88 mL/s, con un volumen de trabajo de 200 mL. En este caso, al contrario de lo observado en el sistema STR/STR (sección 6.1.1), la desorción de oxígeno en el compartimento PFR fue suficiente para generar

**Tabla 6.1. Gradientes de OD posibles en condiciones de cultivo típicas de CA. Valores obtenidos de la solución numérica del balance de masa [ecuaciones (2-4) y (2-5)] en el sistema de doble compartimento STR-STR de la Figura 2.4.**

| $k_L a$<br>( $h^{-1}$ ) | Gradiente <sup>a,b</sup> : $OD_{(STR \text{ no limitante})} - OD_{(STR \text{ limitante})}$<br>(%) |             |                       |             |                          |             |                             |             |
|-------------------------|--|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
|                         | Agua, sin células <sup>c</sup>   |             | Mamífero <sup>d</sup> |             | Insecto, H5 <sup>e</sup> |             | Insecto, Tn-4h <sup>f</sup> |             |
|                         | $t_c$ 500 s  | $t_c$ 125 s | $t_c$ 500 s           | $t_c$ 125 s | $t_c$ 500 s              | $t_c$ 125 s | $t_c$ 500 s                 | $t_c$ 125 s |
| 2                       | 20 - 17.1  | 20 - 19.2   | 20 - 6.7              | 20 - 16.3   | 16.2 - 0                 | 20 - 17.1   | 12.2 - 0                    | 3.2 - 0     |
| 4                       | 20 - 15.0  | 20 - 18.5   | 20 - 5.8              | 20 - 15.6   | 20 - 0                   | 20 - 16.4   | 20 - 0                      | 12.7 - 0    |
| 6                       | 20 - 13.3  | 20 - 17.8   | 20 - 5.2              | 20 - 15.1   | 20 - 0                   | 20 - 15.8   | 20 - 0                      | 20 - 6.0    |

(<sup>a</sup>)  $V_{(A)} = 150$  mL,  $V_{(B)} = 300$  mL,  $V_{\text{tuberías}} = 50$  mL,  $V_{\text{total}} = 500$  mL. Sólo aireación superficial, mismo  $k_L a$  en ambos STR. OD inicial de 20 % en ambos compartimentos.  $t_c = 500$  s con flujo  $F = 1$  mL/s.  $t_c = 125$  s con  $F = 4$  mL/s. En CI, infección en etapa media exponencial, MDI = 10 ufp/célula.

(<sup>b</sup>) Se muestra la magnitud de los gradientes de OD que se pueden obtener en el estado estable.

(<sup>c</sup>) Tiempo en alcanzar el estado estable ( $t_E$ ): Para  $t_c = 500$  s,  $t_E < 1200$  s; para  $t_c = 125$  s,  $t_E < 400$  s.

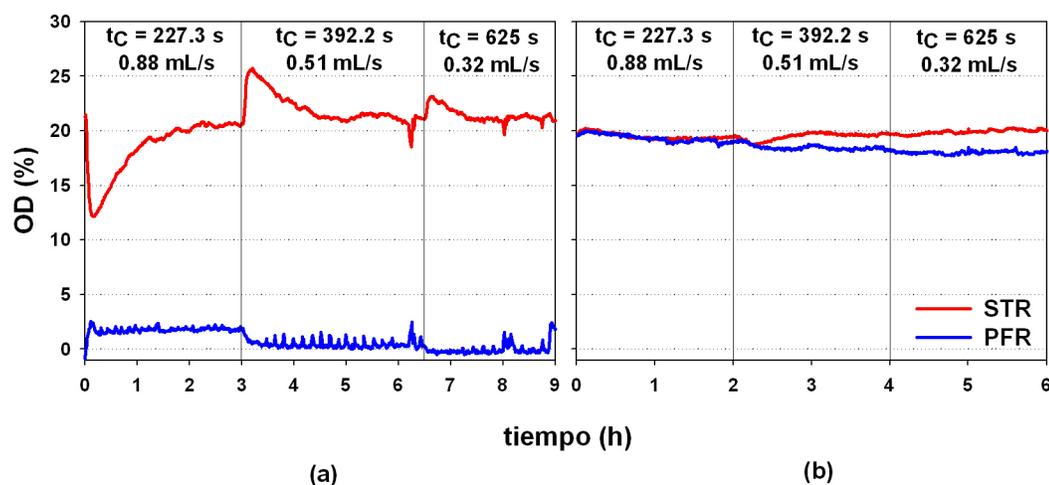
(<sup>d</sup>)  $Q_{O_2} = 1.5 \times 10^{-10}$  mmol/célula h,  $X = 2.5 \times 10^6$  células/mL. Para  $t_c = 500$  s,  $t_E < 1800$  s; para  $t_c = 125$  s,  $t_E < 380$  s.

(<sup>e</sup>)  $Q_{O_2} = 9.1 \times 10^{-10}$  mmol/célula h,  $X = 1.5 \times 10^6$  células/mL. Para  $t_c = 500$  s,  $t_E < 800$  s; para  $t_c = 125$  s,  $t_E < 450$  s.

(<sup>f</sup>)  $Q_{O_2} = 1.6 \times 10^{-9}$  mmol/célula h,  $X = 1.0 \times 10^6$  células/mL. Para  $t_c = 500$  s,  $t_E < 900$  s; para  $t_c = 125$  s,  $t_E < 1150$  s.

gradientes de OD. En estas condiciones fue posible simular un ambiente heterogéneo en un medio acuoso sin células, con gradientes de OD de 20.4 a 1.8 % ( $t_c = 227.3$  s), 21.2 a 0.4 % ( $t_c = 392.2$  s), y 21.1 a 0.1 % ( $t_c = 625$  s) (Figura 6.1a). Así mismo, para los anteriores  $t_c$  se pudo simular también un ambiente homogéneo, con OD constante en ambos compartimentos (Figura 6.1b).

Los perfiles de estos gradientes, generados por la desorción del gas en el sistema, se estimaron mediante la solución numérica del balance de masa para el compartimento PFR [ecuación (5-28)]. Los valores de  $k_L$  (0.00185, 0.00215 y 0.0027 cm/s, para flujos de 0.32, 0.51 y 0.88 mL/s) se determinaron experimentalmente a partir de los valores de OD medidos al final de tuberías de 4, 7.5 y 21 m en los tres flujos evaluados. Se encontró que con esta capacidad de transferencia de masa el OD al final de este compartimento podría alcanzar mínimos de 0, 0.2 y



**Figura 6.1.** Perfiles de OD en el sistema STR/PFR, en medio acuoso con  $t_C$  de 227.3, 392.2 y 625 s. Se muestran los datos registrados por los electrodos dentro del STR y a la salida del PFR: (a) ambientes heterogéneos simulados, con gradientes de OD, (b) ambientes homogéneos simulados, con OD no limitante en ambos compartimentos.

0.8 %, con  $t_C$  de 625, 392.2 y 227.3 s, respectivamente (Figura 6.2d, e y f). Sin embargo, la relación de volumen bien mezclado a volumen mal mezclado ( $V_{bm}/V_{mm}$ ) resultó entre 3.0 y 10.3, si se considera como mal mezclado el volumen con OD limitante para células de insecto (Tabla 6.2). Estos valores representan una desventaja de este sistema, pues son un orden de magnitud superiores a los observados en escala industrial (entre 0.25 y 0.5, según Oosterhuis y Kossen, 1984).

En cultivos bacterianos, generalmente los gradientes en biorreactores PFR se producen mediante el consumo del sustrato por las células, ya que las altas concentraciones celulares pueden producir altas demandas volumétricas por el sustrato en cuestión. Por el contrario, en CA los consumos de sustrato no suelen ser tan altos, por lo que pueden no ser suficientes para generar gradientes significativos en este tipo de sistemas, principalmente a bajos  $t_C$  (Palomares y Ramírez, 2000a).

De forma similar al caso de la desorción, por medio de la ecuación (5-28) se evaluaron teóricamente los gradientes de OD que se podrían producir sólo por el consumo del mismo en cultivos de CA. Se consideró para esto un cultivo de CI Tn-4h infectadas ( $1 \times 10^6$  células/mL, MDI = 10 ufp/célula), en las que se han observado

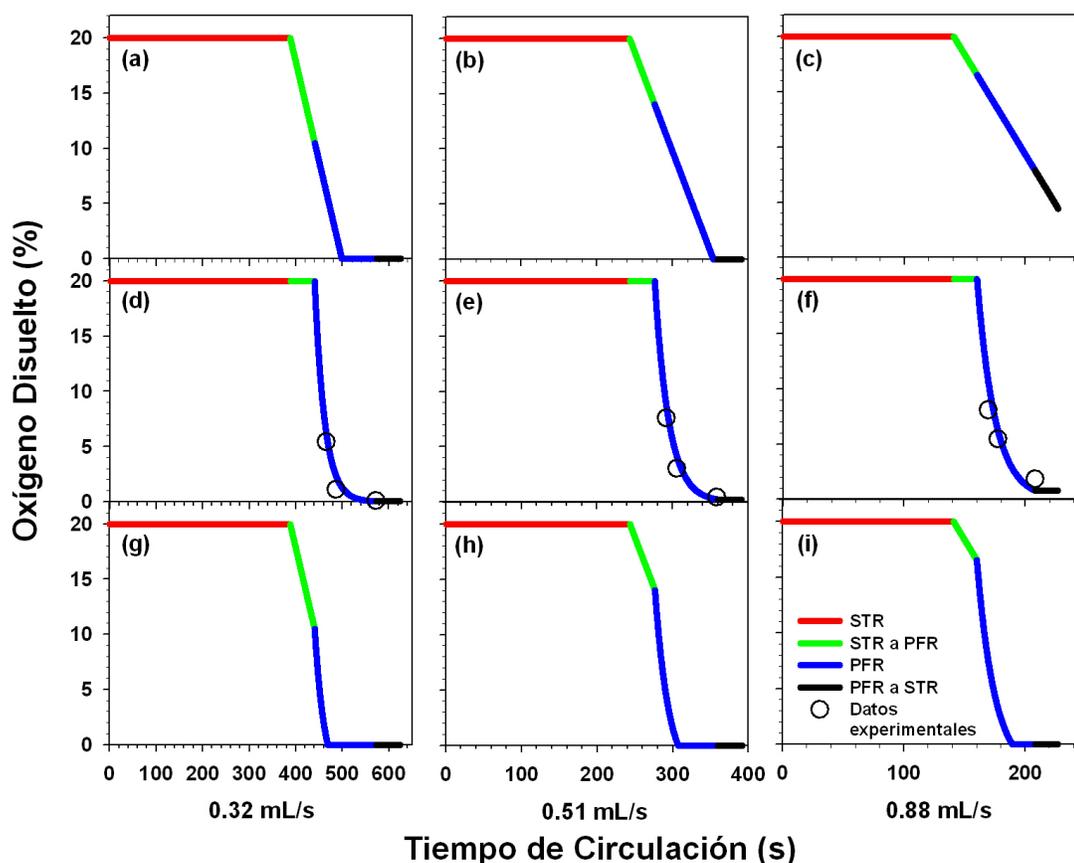


Figura 6.2. Perfil del gradiente de OD en un sistema de doble compartimento STR/PFR, estimado para diferentes flujos de recirculación mediante la solución numérica del balance de masa para el compartimento PFR [ecuación (5-28)]. En (a), (b) y (c), se consideró sólo el consumo de células  $Tn-4h$  infectadas ( $1 \times 10^6$  células/mL,  $MDI = 10$  ufp/célula,  $q_{O_2} = 1.63 \times 10^{-9}$  mmol/célula h). En (d), (e) y (f), se consideró sólo la desorción a través de la pared del tubo permeable de silicón. En (g), (h) e (i), se consideró tanto la desorción como el consumo de oxígeno.

algunas de las más altas demandas específicas de oxígeno ( $1.63 \times 10^{-9}$  mmol/célula h, en tanque agitado, presente trabajo). Se encontró que con sólo este consumo también se podría disminuir el OD hasta 0 %, pero sólo en los  $t_c$  más altos (Figura 6.2a y b), mientras que resultaría insuficiente para obtener el mismo gradiente a  $t_c$  de 227.3 s (Figura 6.2c). En éste caso se alcanzaría un OD mínimo de 7.9 % a la salida del compartimento PFR, y de 4.4 % al final del conector PFR a STR, lo que no representa ventaja sobre lo obtenido por el efecto de desorción en el PFR.

**Tabla 6.2. Razones de  $V_{bm}/V_{mm}$ , estimadas a partir del tiempo de exposición a condiciones limitantes de OD, en el simulador STR/PFR de la Figura 5.2.**

| $t_c$ , (s)   | Criterio de $t_{OD}$ limitante, (s) |                |              | $V_{bm} / V_{mm}$                   |                                     |                                  |
|---|-------------------------------------|----------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
|   | $t_{OD < 5\%}$                      | $t_{OD < 2\%}$ | $t_{anoxia}$ | $\frac{t_{OD > 5\%}}{t_{OD < 5\%}}$ | $\frac{t_{OD > 2\%}}{t_{OD < 2\%}}$ | $\frac{t_{con O_2}}{t_{anoxia}}$ |
| <i>Sin células, sólo desorción en PFR (Figura 6.2d, e y f)</i>                    |                                     |                |              |                                     |                                     |                                  |
| 625.0   | 154.4                               | 134.3          | 55.2         | 3.0                                 | 3.7                                 | 10.3                             |
| 392.2   | 89.9                                | 72.6           | 0            | 3.4                                 | 4.4                                 | -                                |
| 227.3   | 46.5                                | 32.7           | 0            | 3.9                                 | 6.0                                 | -                                |
| <i>Con células, consumo de <math>O_2</math> y desorción (Figura 6.2g, h e i).</i> |                                     |                |              |                                     |                                     |                                  |
| 625.0   | 174.0                               | 165.1          | 156.7        | 2.6                                 | 2.8                                 | 3.0                              |
| 392.2   | 102.1                               | 93.8           | 85.5         | 2.8                                 | 3.2                                 | 3.6                              |
| 227.3   | 53.4                                | 46.1           | 38.2         | 3.3                                 | 3.9                                 | 5.0                              |

En otras líneas celulares generalmente la demanda de oxígeno es menor. En CI Tn-4h no infectadas, CI Sf9 no infectadas y células CHO (ovario de hámster chino), se han observado  $q_{O_2}$  de  $2.61 \times 10^{-10}$  (este trabajo),  $3.82 \times 10^{-10}$  (Palomares y Ramírez, 1996) y  $2.35 \times 10^{-10}$  mmol/célula h (Palomares y Ramírez, 2000b), respectivamente. Se considera que los valores típicos de  $X_v$  y  $q_{O_2}$  para CA son del orden de  $3 \times 10^6$  células/mL y  $4 \times 10^{-10}$  mmol/célula h (Palomares y Ramírez, 2000b). Utilizando estos valores para resolver la ecuación (5-28), se estimó que se podrían alcanzar gradientes de 20 a 0 % de OD sólo en el  $t_c$  más alto. Sin embargo, de nuevo este consumo resultaría insuficiente para obtener el mismo gradiente a  $t_c$  de 392.2 y 227.3 s, alcanzando OD mínimos de sólo 4.6 y 11.1 % al final del PFR, y de 0.2 y 8.5 % al final del conector PFR a STR.

Aunque el consumo por sí mismo no mejoraría el resultado obtenido por la transferencia de masa en el PFR, al considerar ambos efectos en el balance de la ecuación (5-28), se encontró que en este simulador se podrían alcanzar gradientes de OD de 20 a 0 % en los tres flujos de recirculación (Figura 6.2g, h e i). La amplitud de estos gradientes sería la necesaria para simular las condiciones de limitación de OD mencionadas anteriormente para cultivos de CA. Sin embargo, en estas condiciones las

razones de  $V_{bm}/V_{mm}$  estimadas para los tres  $t_c$  estarían entre 2.6 y 5.0 (Tabla 6.2), todavía un orden de magnitud superiores a lo observado en escala industrial. Debido a lo anterior, se decidió evaluar también una configuración basada en dos compartimentos PFR interconectados, para disminuir el  $V_{bm}$  con respecto al  $V_{mm}$ .

### 6.1.3. Sistema de doble compartimento PFR/PFR

En este diseño, descrito en la sección 5.3.3 (Figura 5.3), se utilizaron flujos de 0.26, 0.43, 0.60 y 0.78 mL/s, con un volumen de trabajo de 180 mL. En estas condiciones se simularon ambientes heterogéneos en un medio acuoso sin células, con gradientes de OD de  $29.8 \pm 3.0$  a  $2.2 \pm 0.1$  % ( $t_c = 230.8$  s),  $27.1 \pm 3.4$  a  $0.9 \pm 0.4$  % ( $t_c = 300$  s),  $27.8 \pm 3.0$  a  $-0.1 \pm 0.4$  % ( $t_c = 418.6$  s) y  $27.6 \pm 3.5$  a  $-0.1 \pm 0.4$  % ( $t_c = 692.3$  s) (Figura 6.3).

Los perfiles de estos gradientes, producidos por la absorción y desorción de gas en el sistema, se estimaron de igual forma que en la sección 6.1.2, mediante la solución numérica del balance de masa para ambos compartimentos de este simulador

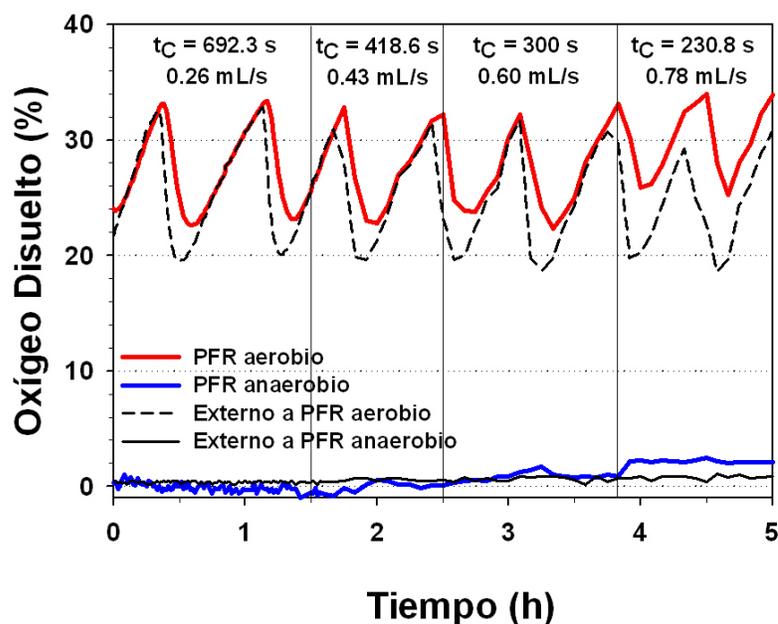


Figura 6.3. Perfiles de OD en el sistema PFR/PFR, en medio acuoso con  $t_c$  de 230.8, 300, 418.6 y 692.3 s. Se muestran los datos registrados por los electrodos al final de cada PFR, así como del ambiente externo utilizado para promover la absorción o desorción de oxígeno en cada compartimento.

[ecuación (5-28)]. Se encontró que, sólo considerando la transferencia de masa, el OD al final del PFR de desorción podría alcanzar mínimos de 0, 0.1, 0.6 y 0.7 %, con  $t_c$  de 692.3, 418.6, 300 y 230.8 s, respectivamente (Figura 6.4e, f, g y h). Así mismo, si se considera como mal mezclado el volumen con OD limitante para células de insecto, la relación  $V_{bm}/V_{mm}$  resultó entre 0.69 y 1.24 (Tabla 6.3), mejorando lo obtenido en el simulador STR/PFR de la sección 6.1.2.

Al resolver la ecuación (5-28), considerando sólo el consumo de oxígeno por un cultivo de células Tn-4h infectadas ( $1 \times 10^6$  células/mL, MDI de 10 ufp/célula,  $q_{O_2}$  de

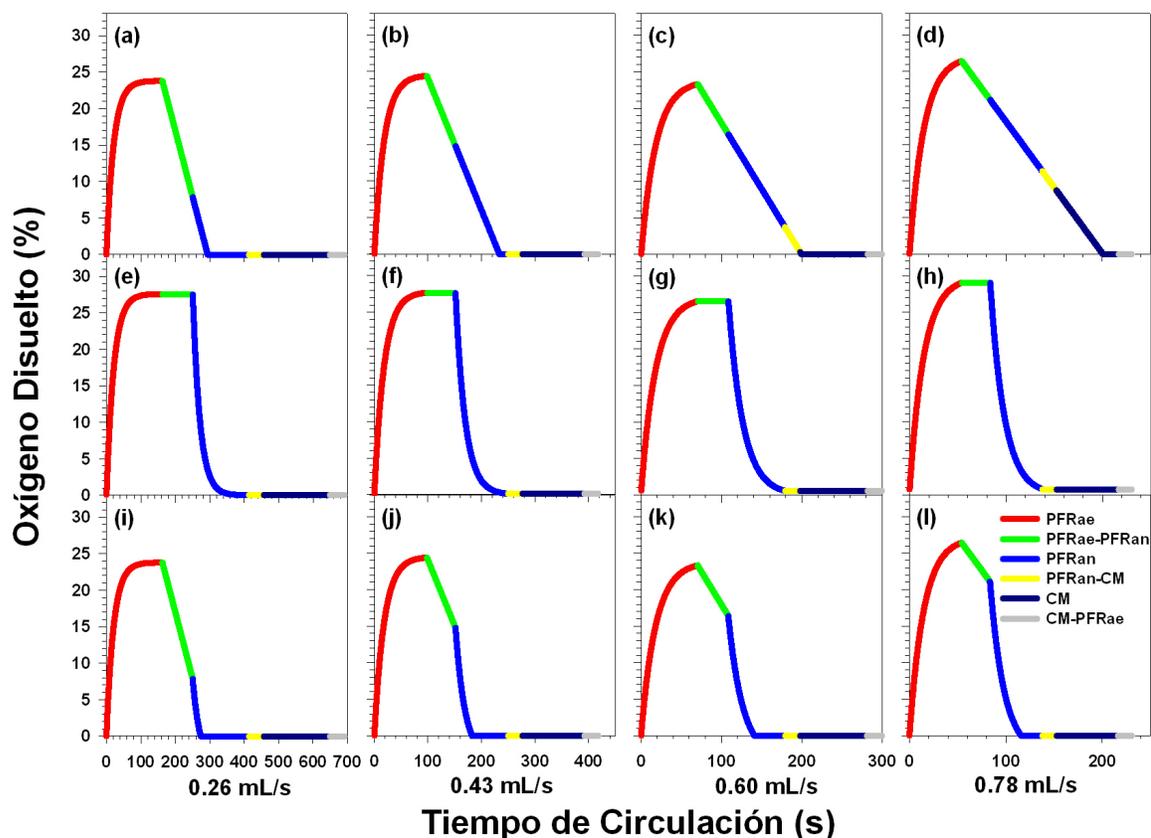


Figura 6.4. Perfil del gradiente de OD en un sistema de doble compartimento PFR/PFR, estimado para diferentes flujos de recirculación mediante la solución numérica del balance de masa para el compartimento PFR [ecuación (5-28)]. En (a), (b), (c) y (d), se consideró sólo el consumo de células Tn-4h infectadas ( $1 \times 10^6$  células/mL, MDI = 10 ufp/célula,  $q_{O_2} = 1.63 \times 10^{-9}$  mmol/célula h). En (e), (f), (g) y (h), se consideró sólo la desorción a través de la pared del tubo permeable de silicón. En (i), (j), (k) y (l), se consideró tanto la desorción como el consumo de oxígeno.

**Tabla 6.3. Razones de  $V_{bm}/V_{mm}$ , estimadas a partir del tiempo de exposición a condiciones limitantes de OD, en el simulador PFR/PFR de la Figura 5.3.**

| $t_c$ , (s)   | Criterio de $t_{OD}$ limitante, (s) |                |              | $V_{bm} / V_{mm}$                   |                                     |                                  |
|---|-------------------------------------|----------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
|   | $t_{OD < 5\%}$                      | $t_{OD < 2\%}$ | $t_{anoxia}$ | $\frac{t_{OD > 5\%}}{t_{OD < 5\%}}$ | $\frac{t_{OD > 2\%}}{t_{OD < 2\%}}$ | $\frac{t_{con O_2}}{t_{anoxia}}$ |
| <i>Sin células, sólo desorción en PFR (Figura 6.4e, f, g y h)</i>                   |                                     |                |              |                                     |                                     |                                  |
| 692.3   | 409.7                               | 387.5          | 309          | 0.69                                | 0.79                                | 1.24                             |
| 418.6   | 239.3                               | 220.1          | 0            | 0.75                                | 0.90                                | -                                |
| 300.0   | 164.2                               | 145.0          | 0            | 0.83                                | 1.07                                | -                                |
| 230.8   | 123.4                               | 107.9          | 0            | 0.87                                | 1.14                                | -                                |
| <i>Con células, consumo de <math>O_2</math> y desorción (Figura 6.4i, j, k y l)</i> |                                     |                |              |                                     |                                     |                                  |
| 692.3   | 440.5                               | 428.6          | 418.4        | 0.57                                | 0.62                                | 0.65                             |
| 418.6   | 256.9                               | 246.0          | 236.4        | 0.63                                | 0.70                                | 0.77                             |
| 300.0   | 179.8                               | 168.9          | 159.2        | 0.67                                | 0.78                                | 0.88                             |
| 230.8   | 133.4                               | 124.1          | 115.2        | 0.73                                | 0.86                                | 1.00                             |

$1.63 \times 10^9$  mmol/célula h), se encontró que en este sistema la demanda de oxígeno también podría disminuir el OD hasta 0 %, en todos los  $t_c$  simulados. Al igual que en el sistema STR/PFR analizado en la sección 6.1.2, la amplitud de estos gradientes también sería la necesaria para simular las condiciones de limitación de OD mencionadas anteriormente para cultivos de CA. Además, dependiendo del criterio para definir el OD limitante, con el efecto combinado del consumo y la desorción del gas en el sistema se podrían alcanzar relaciones  $V_{bm}/V_{mm}$  entre 0.57 y 1.00 (Tabla 6.3), que se aproximan más a lo esperado en biorreactores de escala de producción.

#### 6.1.4. Esfuerzos de corte

De acuerdo con los flujos de recirculación utilizados, el intervalo de esfuerzos de corte máximos estimados en los compartimentos PFR de ambos simuladores fue de  $0.58 < \tau_w, N/m^2 < 1.96$  ( $641 < \gamma, s^{-1} < 2181$ ) (Tabla 6.4), indicando que en ambos sistemas los niveles de estrés hidrodinámico son inferiores a los reportados como letales en cultivos de CA. En células de mamífero (HeLa S3 y L929) se ha observado que presentan daño celular cuando se someten a  $\tau$  de 10 a 200  $N/m^2$  (Augenstein et al., 1971), mientras que células de insecto Sf9 pueden tolerar esfuerzos de corte de

**Tabla 6.4. Esfuerzos de corte y gradientes de deformación estimados para los compartimentos PFR de los sistemas evaluados en este trabajo.**

| Sistema  | Flujo (mL/s) | $t_c^a$ (s) | $Re^b$ | $\tau_w^c$ (N/m <sup>2</sup> ) | $\gamma^d$ (s <sup>-1</sup> ) |
|----------|--------------|-------------|--------|--------------------------------|-------------------------------|
| STR-loop | 1            | 278         | 178    | 0.02                           | 21                            |
|          | 4            | 76          | 714    | 0.07                           | 83                            |
| STR-PFR  | 0.32         | 227.3       | 283    | 0.72                           | 798                           |
|          | 0.51         | 392.2       | 446    | 1.13                           | 1259                          |
|          | 0.88         | 625         | 773    | 1.96                           | 2181                          |
| PFR-PFR  | 0.26         | 692.3       | 240    | 0.58                           | 641                           |
|          | 0.43         | 418.6       | 403    | 0.97                           | 1077                          |
|          | 0.60         | 300         | 532    | 1.35                           | 1501                          |
|          | 0.78         | 230.8       | 722    | 1.73                           | 1927                          |

<sup>(a)</sup> En sistemas de doble compartimento, el  $t_c = V_T / Q$ , donde  $V_T$  es el volumen total de cultivo (mL) y  $Q$  es el flujo volumétrico de recirculación (mL/s).

<sup>(b)</sup> En una tubería cilíndrica el régimen de flujo se caracteriza por el *Número de Reynolds*  $\{Re = D_i v \rho / \eta$ , adimensional, donde:  $D_i$  es el diámetro interno de la tubería (cm),  $v$  es la velocidad lineal del fluido (cm/s) [ $v = Q/A$ , donde  $Q$  es el flujo volumétrico de recirculación (mL/s) y  $A$  es el área transversal de la tubería (cm<sup>2</sup>)],  $\rho$  es la densidad (kg/cm<sup>3</sup>) y  $\eta$  es la viscosidad dinámica (kg/cm s)}. Cuando  $Re < 2\,000$  el flujo es laminar, cuando  $2\,000 < Re < 4\,000$  el flujo es de transición y cuando  $Re \geq 4\,000$  el flujo es turbulento.

<sup>(c)</sup> Calculado a partir del flujo volumétrico de recirculación  $Q$ , mediante la ecuación (5-36).

<sup>(d)</sup> El valor para el gradiente de deformación ( $\gamma = dv/dr$ ) se calculó a partir de  $\tau_w$  mediante la ecuación (5-29).

hasta 4.51 N/m<sup>2</sup> ( $\gamma = 3000\text{ s}^{-1}$ ) durante 15 min cuando se agrega Pluronic F-68 al medio de cultivo (Palomares et al., 2000). Así mismo, en hibridomas murinos HB-32 se ha reportado que pueden soportar  $\tau$  de hasta 7.2 N/m<sup>2</sup> ( $\gamma = 8000\text{ s}^{-1}$ ) durante 20 min, en medios suplementados con colesterol, suero fetal bovino y Pluronic F-68 (Ramírez y Mutharasan, 1990b). Otros ejemplos se pueden observar en la Tabla 2.2.

Por otra parte, los mayores esfuerzos de corte causados por la agitación, tanto en el tanque agitado como en la cámara de muestreo de los simuladores STR/PFR y PFR/PFR respectivamente, fueron de 0.32 y 0.07 N/m<sup>2</sup> ( $\gamma$  de 376 y 83 s<sup>-1</sup>) (Tabla 6.5), siendo también inferiores a los reportados como tolerables por CA. Además, el tamaño de la microescala de Kolmogorov generada por la agitación fue un orden de magnitud

**Tabla 6.5. Esfuerzos de corte, gradientes de deformación y microescala de Kolmogorov, estimados<sup>a</sup> para los compartimentos STR de los simuladores evaluados en este trabajo.**

| Sistema                         | N     |                    | Re   | N <sub>P</sub> <sup>b</sup> | ε <sup>c</sup> | τ <sub>máx</sub> <sup>d</sup> | γ <sup>e</sup> | λ <sub>K</sub> <sup>f</sup> |
|---------------------------------|-------|--------------------|------|-----------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|-----------------------------|
|                                 | (rpm) | (s <sup>-1</sup> ) |      |                             |                |                               |                |                             |
| STR recirculado                 | 120   | 2                  | 4723 | 0.36                        | 0.0018         | 0.21                          | 242            | 137.5                       |
| STR/PFR                         | 120   | 2                  | 4723 | 0.36                        | 0.0043         | 0.32                          | 376            | 110.2                       |
| PFR/PFR<br>(cámara de muestreo) | 80    | 1.3                | 972  | 0.45                        | 0.0002         | 0.07                          | 83             | 234.8                       |

(<sup>a</sup>) Se utilizaron los siguientes valores:  $\rho_{27^{\circ}\text{C}} = 996.6 \text{ kg/m}^3$ ,  $\eta_{27^{\circ}\text{C}} = 8.546 \times 10^{-4} \text{ Ns/m}^2$ ,  $\nu_{27^{\circ}\text{C}} = 8.576 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ . Impulsores de los sistemas STR recirculado y STR/PFR,  $D = 4.5 \text{ cm}$ . Impulsor de la cámara de muestreo en el sistema PFR/PFR,  $D = 2.5 \text{ cm}$ . Medio de cultivo en el STR recirculado: 0.3 kg. Medio de cultivo en el STR/PFR: 0.124 kg. Medio de cultivo en la cámara de muestreo del PFR/PFR: 0.05 kg.

(<sup>b</sup>) Al no encontrarse reportes sobre la caracterización del  $N_P$  para agitadores magnéticos, se asumió el valor reportado para turbinas marinas (Bailey y Ollis, 1977), en las cuales se han observado algunos de los menores niveles de estrés hidrodinámico.

(<sup>c</sup>) Calculado mediante la ecuación (2-8).

(<sup>d</sup>) Calculado mediante la ecuación (2-11).

(<sup>e</sup>) Calculado mediante la ecuación (5-29).

(<sup>f</sup>) Calculado mediante la ecuación (2-6).

superior al tamaño celular, por lo que se puede suponer que la interacción de las células en cultivo con los microtorbellinos no sería significativa.

Aunque los niveles máximos de  $\tau_w$ ,  $\tau_{máx}$ ,  $\gamma$  y  $\lambda_K$  fueron inferiores a los valores letales reportados para CA en cultivo, se deben descartar aún los efectos de tipo subletal (ver Tabla 2.4, sección 2.4), provocados en este caso tanto por la magnitud del estrés hidrodinámico como por la naturaleza intermitente a la que serían expuestas las células en las configuraciones de doble compartimento evaluadas.

## 6.2. Cultivo de células animales en sistemas de doble compartimento

### 6.2.1. Tolerancia de células de insecto a la recirculación mediante bomba peristáltica

En la aplicación de los sistemas de doble compartimento para simular gradientes, el estrés provocado a las células por los esfuerzos de corte producidos en los cabezales de las bombas es uno de los inconvenientes principales. Éstos pueden afectar al cultivo negativamente, además de estar presentes también los esfuerzos de corte

tanto en la pared de los compartimentos PFR ( $\tau_w$ ) como los causados por la agitación mediante el impulsor en los tanques tipo STR ( $\tau_{m\acute{a}x}$ ).

Para evaluar este efecto se realizaron cinéticas de crecimiento con CI Tn-4h en el sistema recirculado STR-loop descrito en la sección 5.3.1 (Figura 5.1), controlando el OD a 25 %. En este sistema se evaluaron cultivos simulando  $t_c$  de 278 y 76 s, en los que los valores de  $\tau_w$  en el circuito de recirculación fueron de 0.02 y 0.07 N/m<sup>2</sup> ( $\gamma$  de 21 y 83 s<sup>-1</sup>, Tabla 6.4), mientras que  $\tau_{m\acute{a}x}$  en el tanque agitado se estimó en 0.21 N/m<sup>2</sup> ( $\gamma = 242$  s<sup>-1</sup>, Tabla 6.5) con microtorbellinos de Kolmogorov superiores en un orden de magnitud al tamaño de las células. El  $\tau_{m\acute{a}x}$  en este compartimento STR puede ser incluso menor (en consecuencia, con  $\lambda_K$  mayor), ya que su valor se estimó considerando el  $N_p$  para un impulsor de tipo propela marina, cuando en realidad se utilizó una barra magnética sujeta al eje del tanque (para este tipo de impulsor no se encontraron curvas de  $N_p$  en función del Re, que permitieran calcular de forma precisa los valores de  $\varepsilon$  y, por consiguiente, los de  $\tau_{m\acute{a}x}$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda_K$ ). En resumen, todas estas condiciones hidrodinámicas fueron inferiores tanto a las reportadas como letales para CA en cultivo (Tabla 2.2) como a aquéllas que los afectan de forma subletal (Tabla 2.4).

En los cultivos recirculados no infectados se observó una viabilidad superior al 95 % durante las etapas de crecimiento exponencial y estacionario, mostrando un comportamiento similar al cultivo control sin recirculación (Figura 6.5a, b y c). Además, las células se multiplicaron exponencialmente en los dos  $t_c$  evaluados, con una  $\mu$  que en ambos casos fue sólo 7.7 % inferior a la observada en el control (Tabla 6.6), demostrando la capacidad de estas células para tolerar el estrés hidrodinámico en el cabezal de la bomba peristáltica. Sin embargo, los decrementos de 30.4 y 43.5 % en las  $X_{v_{m\acute{a}x}}$  alcanzadas con los  $t_c$  de 278 y 76 s, respecto al cultivo no recirculado (Tabla 6.6), hacen suponer la existencia de efectos subletales, que podrían resultar en aumentos de la energía de mantenimiento y una disminución del rendimiento de células. Éstos al parecer impiden al cultivo alcanzar altas concentraciones celulares, sin provocar daños que disminuyan la proporción de células viables.

De igual forma, en las condiciones de recirculación mencionadas anteriormente se demostró la capacidad de estas células de producir PR (Figura 6.5d, e y f) al

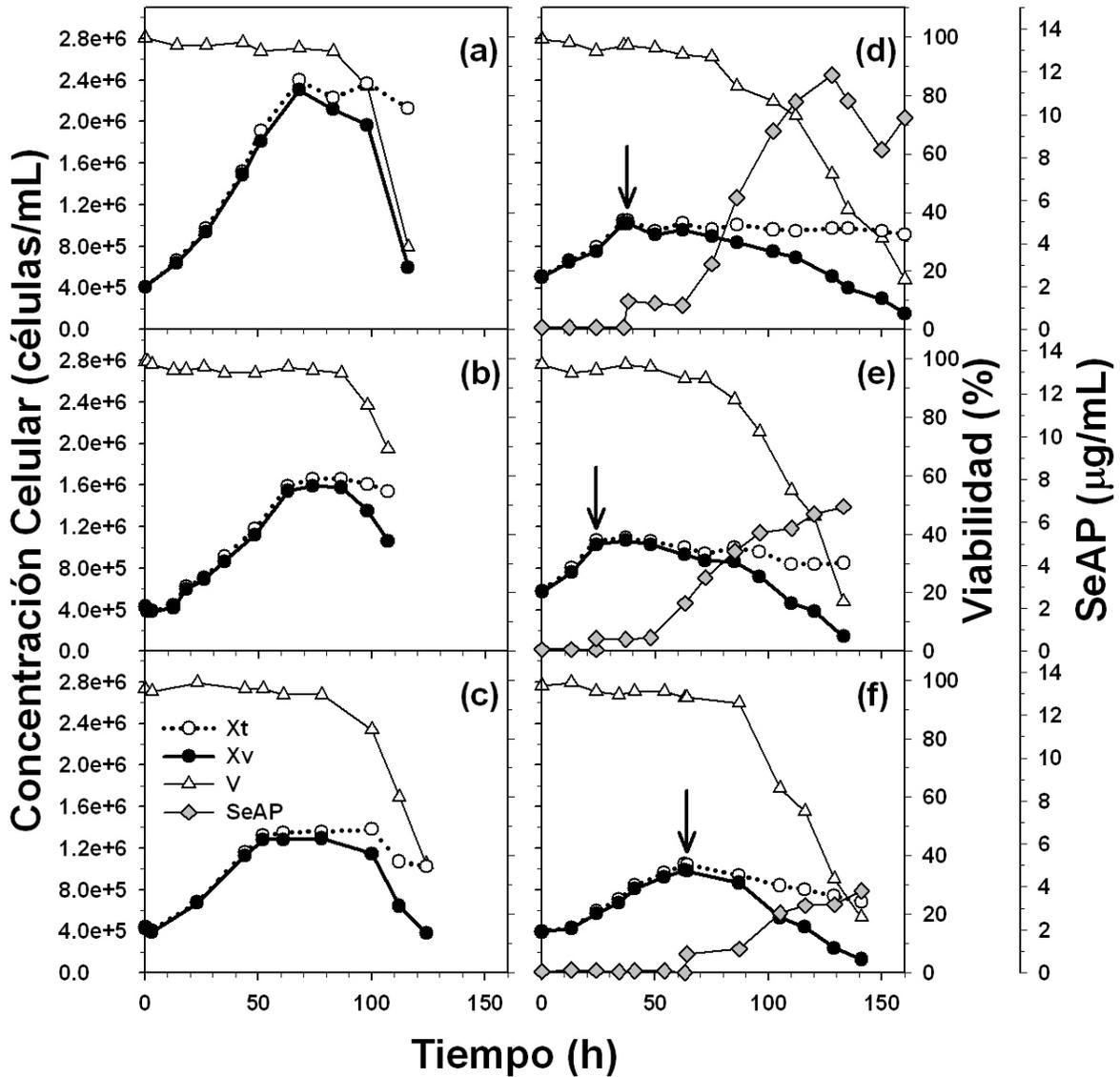


Figura 6.5. Cinéticas de crecimiento de CI Tn-4h en el sistema recirculado STR-loop (Figura 5.1). (a), (b) y (c) son cultivos no infectados; (d), (e) y (f) son cultivos infectados, con producción de PR (SeAP). Las flechas indican el TDI =  $1 \times 10^6$  células/mL, con MDI = 10 ufp/célula. (a) y (d), cultivos control, en STR sin circuito de recirculación; (b) y (e), cultivos recirculados a 1 mL/s ( $t_c = 278$  s); (c) y (f), cultivos recirculados a 4 mL/s ( $t_c = 76$  s).

infectarlas con el baculovirus descrito en la sección 5.2. En este caso hubo una reducción entre 43.2 y 67.8% en la producción volumétrica total de SeAP de los cultivos recirculados, con respecto al cultivo control (Tabla 6.6). Esto sustenta la idea anterior de un posible efecto subletal provocado por la recirculación, ya que se reduce

**Tabla 6.6. Parámetros de los cultivos de CI Tn-4h en el biorreactor recirculado de la Figura 5.1.**

| Condición de cultivo             | $\mu$<br>(h <sup>-1</sup> ) | X <sub>v</sub> <sup>máx</sup><br>(células/mL) | SeAP<br>( $\mu$ g/mL) |
|----------------------------------|-----------------------------|---|-----------------------|
| <i>No infectados:</i>            |                             |   |                       |
| STR, No recirculado              | 0.026                       | 2.3 x 10 <sup>6</sup>                         | -                     |
| STR-loop, t <sub>c</sub> = 278 s | 0.024                       | 1.6 x 10 <sup>6</sup>                         | -                     |
| STR-loop, t <sub>c</sub> = 76 s  | 0.024                       | 1.3 x 10 <sup>6</sup>                         | -                     |
| <i>Infectados:</i>               |                             |   |                       |
| STR, No recirculado              | 0.019 *                     | 1 x 10 <sup>6</sup> *                         | 11.8                  |
| STR-loop, t <sub>c</sub> = 278 s | 0.024 *                     | 1 x 10 <sup>6</sup> *                         | 6.7                   |
| STE-loop, t <sub>c</sub> = 76 s  | 0.022 *                     | 1 x 10 <sup>6</sup> *                         | 3.8                   |

(\*) Las  $\mu$  fueron estimadas en la etapa preinfección. El valor de X<sub>v</sub><sup>máx</sup> es el mismo debido al cese del crecimiento exponencial al infectar con MDI = 10 ufp/célula.

la productividad de SeAP al incrementarse el estrés hidrodinámico. Aún así, en las tres condiciones se produjo de 2.4 a 7.4 veces más proteína heteróloga que la obtenida en cultivos agitados en “*spinner*” (1.6  $\mu$ g/mL, este trabajo) y de 4.2 a 13.1 veces la obtenida en cultivos estáticos en frasco T-75 (0.9  $\mu$ g/mL, este trabajo).

Keane et al. (2003) reportaron un comportamiento similar en la producción de PR, en cultivos de células CHO adheridas a una cámara de crecimiento celular, con recambio de medio en condiciones de flujo laminar. Estos autores observaron un cese en la producción de hormona de crecimiento humana (hGH, “*human Growth Hormone*”), al exponer las células a esfuerzos de corte de 0.1 N/m<sup>2</sup>, aún cuando no hubo diferencias en viabilidad ni morfológicas entre las células sometidas al flujo laminar y el cultivo control (cultivo estático). Este efecto fue contrarrestado al agregar PF-68 al medio de cultivo, sin embargo, aún en presencia de este surfactante la productividad de hGH fue de sólo el 49 % con respecto al control, al incrementarse el esfuerzo de corte entre 0.005 y 0.8 N/m<sup>2</sup>. Además, bajo estas condiciones se registraron incrementos de 42 % en el consumo de glucosa, así como decrementos en la producción de lactato que, aunados a la reducción en la producción de hGH, reflejaron cambios metabólicos significativos relacionados con la exposición a niveles subletales de estrés hidrodinámico, que impactaron el rendimiento de productos a

partir de glucosa.

Cabe resaltar que los esfuerzos de corte que provocaron estos efectos en células CHO en el trabajo de Keane et al. (2003), son del mismo orden de magnitud que los generados en el sistema STR recirculado del presente trabajo. Aquí se observaron también alteraciones tanto en el consumo de glucosa como en la producción de lactato y de PR, relacionadas con la exposición del cultivo a distintos niveles de estrés hidrodinámico.

Al experimentar  $\tau_w$  de 0.02 y 0.07 N/m<sup>2</sup>, la  $q_{Glc}$  se redujo con respecto al cultivo control entre 32.3 y 40.5 % en la etapa preinfección, aunque el  $Y_{Xv/Glc}$  fue superior en ambos casos (1.95 veces) (Tabla 6.7). Como se describió anteriormente, la viabilidad en ambas condiciones de recirculación fue superior al 95 % (Figura 6.5), pero las  $\mu$  y las  $X_{V_{m\acute{a}x}}$  alcanzadas fueron inferiores (Tabla 6.6). Esto, aunado al hecho de que el rendimiento biomasa/glucosa fue casi el doble en ambas condiciones, puede ser un indicio de que el carbono de la glucosa se está utilizando en mayor medida para el mantenimiento de la integridad celular, dirigiéndose más hacia la biosíntesis (por ejemplo, de ácidos grasos para reparar las membranas) que a la obtención de energía. Esta idea se puede apoyar también por la producción de lactato, ya que al disminuir el consumo de glucosa se registró también un descenso de 59.5 y 83.2 % en la  $q_{Lac}$ , pero con  $Y_{Lac/Glc}$  de 0.6 y 0.3 veces los observados en el cultivo no recirculado (Tabla 6.8), lo que indica una menor proporción del carbono de la glucosa asimilada utilizado para obtener energía.

En la etapa postinfección de las tres condiciones evaluadas, las demandas específicas de glucosa con respecto a las condiciones no infectadas tuvieron un descenso de 7.6, 5 y 31 % (cultivo sin recircular, con  $t_c = 278$  s y con  $t_c = 76$  s, respectivamente) (Tabla 6.7). Así mismo, las  $q_{Glc}$  en los cultivos recirculados se redujeron con respecto al cultivo control entre 30.4 y 55.5 % (Tabla 6.7). Esto se reflejó en disminuciones hasta de 54.5 y 67.8 % en la  $q_{SeAP}$  y la producción volumétrica de PR al incrementarse el estrés hidrodinámico (Tablas 6.9 y 6.6). El cultivo no recirculado presentó producción de lactato al inicio de la infección, que después fue consumido en parte (valores negativos de  $q_{Lac}$  y  $Y_{Lac/Glc}$ ) al agotarse la glucosa a las 48 horas postinfección (hpi) (a las 86 h de cultivo), mientras que en los cultivos recirculados sólo

**Tabla 6.7. Consumo de glucosa en cultivos de células Tn-4h con y sin recirculación mediante bombeo peristáltico.**

| Sistema,<br>$\tau_w(N/m^2), t_c(s)$ | Preinfección  |   | Postinfección <sup>a</sup>                              |
|-------------------------------------|---|---|---|
|                                     | $q_{Glc}$<br>( $\mu g_{Glc} / 1 \times 10^6$ células h) | $Y_{Xv / Glc}$<br>(células / $mg_{Glc}$ ) | $q_{Glc}$<br>( $\mu g_{Glc} / 1 \times 10^6$ células h) |
| STR,<br>no recirculado              | 35.3  | $5.38 \times 10^5$                        | 32.6  |
| STR-loop,<br>0.02, 278              | 23.9  | $1.05 \times 10^6$                        | 22.7  |
| STR-loop,<br>0.07, 76               | 21.0  | $1.05 \times 10^6$                        | 14.5  |

(<sup>a</sup>) El  $Y_{Xv / Glc}$  no fue calculado en la etapa postinfección debido a que la alta MDI utilizada provocó el cese en el crecimiento.

**Tabla 6.8. Producción de lactato en cultivos de células Tn-4h con y sin recirculación mediante bombeo peristáltico.**

| Sistema,<br>$\tau_w(N/m^2), t_c(s)$ | Preinfección  |  | Postinfección   |  |
|-------------------------------------|---|--|---|--|
|                                     | $q_{Lac}$<br>( $\mu g_{Lac} / 1 \times 10^6$ células h) | $Y_{Lac / Glc}$<br>( $g_{Lac} / g_{Glc}$ ) | $q_{Lac}$<br>( $\mu g_{Lac} / 1 \times 10^6$ células h) | $Y_{Lac / Glc}$<br>( $g_{Lac} / g_{Glc}$ ) |
| STR,<br>no recirculado              | 19.0  | 0.54                                       | -11.8 <sup>a</sup>                                      | -0.36 <sup>a</sup>                         |
| STR-loop,<br>0.02, 278              | 7.7   | 0.32                                       | 6.0   | 0.26                                       |
| STR-loop,<br>0.07, 76               | 3.2   | 0.15                                       | 2.2   | 0.15                                       |

(<sup>a</sup>) Se observó consumo de lactato cuando se agotó la glucosa.

**Tabla 6.9. Producción de SeAP en cultivos de células Tn-4h con y sin recirculación mediante bombeo peristáltico.**

| Sistema,<br>$\tau_w(N/m^2), t_c(s)$ | Postinfección   |  |  |
|-------------------------------------|---|--|--|
|                                     | $q_{SeAP}$<br>( $\mu g_{SeAP} / 1 \times 10^6$ células h) | $Y_{SeAP / Glc}$<br>( $g_{SeAP} / g_{Glc}$ ) | $Y_{SeAP / Lac}$<br>( $g_{SeAP} / g_{Lac}$ ) |
| STR,<br>no recirculado              | 0.2233  | 0.0068                                       | 0.0189 <sup>a</sup>                          |
| STR-loop,<br>0.02, 278              | 0.1018  | 0.0045                                       | -  |
| STR-loop,<br>0.07, 76               | 0.1016  | 0.0070                                       | -  |

(<sup>a</sup>) Se calculó debido a que hubo consumo de lactato mientras se mantuvo una producción importante de SeAP.

hubo producción del mismo, con decrementos en la  $q_{\text{Lac}}$  y el  $Y_{\text{Lac}/\text{Glc}}$  de 63 y 42 % respectivamente, al aumentar  $\tau_w$  (Tabla 6.8). Aunque el  $Y_{\text{SeAP}/\text{Glc}}$  en el cultivo no recirculado fue similar a los registrados bajo estrés hidrodinámico, tal vez las necesidades de carbono en este cultivo –para sostener una mayor y más veloz producción de SeAP– fueron suplidas mediante el consumo de parte del lactato producido previamente y, probablemente, de la glutamina presente en el medio (que no fue cuantificada y de la que se conoce es un componente determinante en el desempeño de cultivos de CI, Palomares, 1996). Las  $q_{\text{SeAP}}$  en ambas condiciones recirculadas fueron similares, sin embargo, el  $Y_{\text{SeAP}/\text{Glc}}$  fue 55.6 % superior con  $\tau_w = 0.07 \text{ N/m}^2$  que cuando fue de  $0.02 \text{ N/m}^2$  (Tabla 6.9) En este cultivo con  $t_c = 76 \text{ s}$ , que alcanzó menor producción volumétrica de SeAP, pero a velocidad similar que el recirculado con  $t_c$  de 278 s, el mayor rendimiento de PR con respecto a la glucosa asimilada indica que se puede estar destinando una mayor cantidad del carbono hacia la biosíntesis, para contender con el daño subletal ocasionado por los esfuerzos de corte, en vez de destinarlo a la obtención de energía, de forma similar a lo observado en condiciones no infectadas.

Se desconoce cuáles son los esfuerzos de corte a los que una CI sometida a bombeo continuo experimenta. Mardikar y Nirajan (2000) reportaron que existen niveles óptimos de estrés hidrodinámico en los cuales las CA son capaces de sobrevivir. Al evaluar la resistencia de varias líneas celulares a esfuerzos que normalmente se encontrarían en biorreactores agitados y burbujeados, encontraron que es tan dañino para las células ser sometidas a esfuerzos de  $1 \text{ N/m}^2$  como de  $100 \text{ N/m}^2$  (durante el mismo periodo de tiempo), presentando a esfuerzos de  $10 \text{ N/m}^2$  niveles óptimos de sobrevivencia y viabilidad. Estos autores sugieren realizar los cultivos de CA a niveles óptimos de esfuerzo, ya sea controlando la velocidad de agitación o mediante el uso de agentes protectores en el medio de cultivo.

El medio TNMFH utilizado en este trabajo está adicionado de 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) y 0.5 % de Pluronic F-68 (PF-68). Se ha observado que estos aditivos protegen del estrés hidrodinámico a las células en cultivo, por efectos tanto físicos como bioquímicos. Los reportes indican que entre los principales mecanismos de protección se encuentran la disminución de la adhesión de las células a las burbujas

y la reducción en la fluidez de la membrana celular (Chisti, 2000; Day y Emery, 1999; Palomares et al., 2000; Wu et al., 1995; Wu et al., 1997). De esta manera, el SFB y el PF-68 pueden estar contribuyendo a la sobrevivencia de las células Tn-4h frente al estrés al que están siendo sometidas en el biorreactor recirculado.

Entre los efectos que podrían presentarse como respuesta a estrés hidrodinámico se encuentran la inducción de apoptosis (muerte celular programada), además de cambios en la síntesis de proteína, en las velocidades de consumo de nutrientes y el pH intracelular (Al-Rubeai et al., 1995; Palomares et al., 2006). En este trabajo, aunque las células están creciendo, manteniendo alta viabilidad y produciendo PR en condiciones definidas de estrés hidrodinámico, es evidente de los resultados descritos hasta ahora que se están produciendo efectos subletales, de tipo fisiológico, que están alterando el metabolismo de las CI Tn-4h. Este efecto se está reflejando en la concentración celular máxima alcanzada en los cultivos recirculados, en la velocidad de producción y el rendimiento de PR y, sobre todo, pueden estar afectando la calidad de la misma. Este tema se abordará más adelante en la sección 6.3.

#### **6.2.2. Evaluación de cultivos de células animales en el sistema STR/PFR, con OD constante**

Para evaluar el desempeño del simulador STR/PFR se utilizaron células Tn-4h y H5 de insecto (no infectadas), así como células CHO de mamífero (Tabla 5.1). Estas líneas celulares fueron cultivadas en medios TNMFH, SF900II e IS-CHO, respectivamente, en condiciones de OD constante a 25 %, con un flujo de recirculación de 0.32 mL/s para probar las condiciones hidrodinámicas menos severas.

**Resultados en células de insecto:** Las CI Tn-4h y H5 mantuvieron viabilidad superior al 90 % durante las primeras 48 h, pero sin mostrar la capacidad de crecer bajo estas condiciones. Tanto la población total como la viable de células Tn-4h comenzó a descender desde el inicio del cultivo, mientras que las células H5 mostraron una concentración celular estable hasta las 48 h, tiempo a partir del cual comenzó la muerte del cultivo (Figura 6.6a y b).

**Resultados en células de mamífero:** En el caso de las células CHO, se observó solamente un crecimiento limitado durante las primeras 24 h, con viabilidad superior

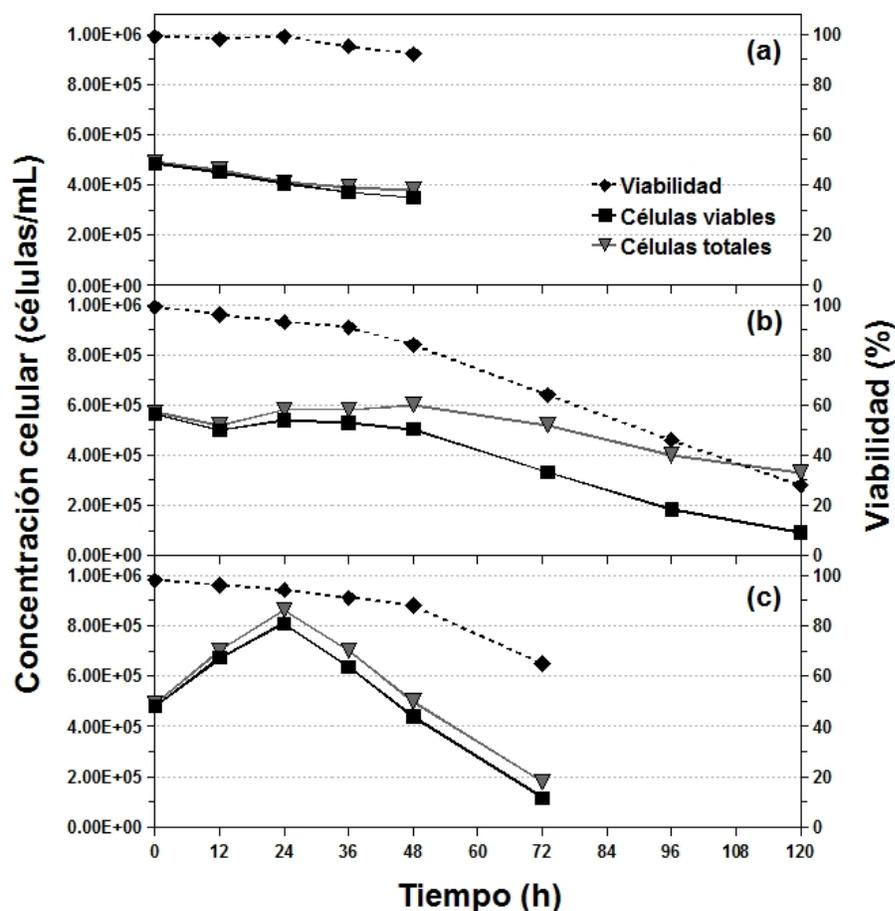


Figura 6.6. Cultivos en el sistema STR/PFR, con células (a) Tn-4h, (b) H5, (c) CHO.

al 90 % hasta las 48 h (Figura 6.6c). Sin embargo, el descenso en la concentración celular total y viable observado a partir de las 24 h indicó lisis de las células, provocado por las condiciones hidrodinámicas en el simulador (ver Tablas 6.4 y 6.5).

### 6.2.3. Evaluación de cultivos de células animales en el sistema PFR/PFR, con OD constante

**Resultados en células de insecto:** El simulador PFR/PFR fue probado con CI Tn-4H y H5 no infectadas, usando medio TNMFH, con OD constante a 25 % y un flujo de recirculación de 0.26 mL/s. Se probaron dos concentraciones iniciales de células Tn-4H,  $5.35 \times 10^5$  y  $8.23 \times 10^5$  células/mL, para determinar el efecto de una mayor concentración de inóculo en el desarrollo del cultivo en este sistema. En ambas condiciones se observó viabilidad superior al 90 % durante las primeras 36 h de cultivo. Sin embargo, sólo el cultivo inoculado con  $8.23 \times 10^5$  células/mL mostró un

crecimiento apenas perceptible, aunque con decremento en la viabilidad desde el inicio del experimento, mientras que en el cultivo iniciado con  $5.35 \times 10^5$  células/mL la población celular comenzó a descender desde el tiempo cero (Figura 6.7a y b). La alta viabilidad registrada en las primeras horas, aunado al descenso en la concentración celular en estas condiciones indica muerte celular por procesos líticos, similar a lo observado en el simulador STR/PFR. Las células H5 se desarrollaron de forma similar, mostrando un ligero crecimiento durante las primeras 60 h de cultivo, pero con un decremento sostenido en la viabilidad, desde 98 hasta 70 %, a partir del tiempo cero (Figura 6.7c).

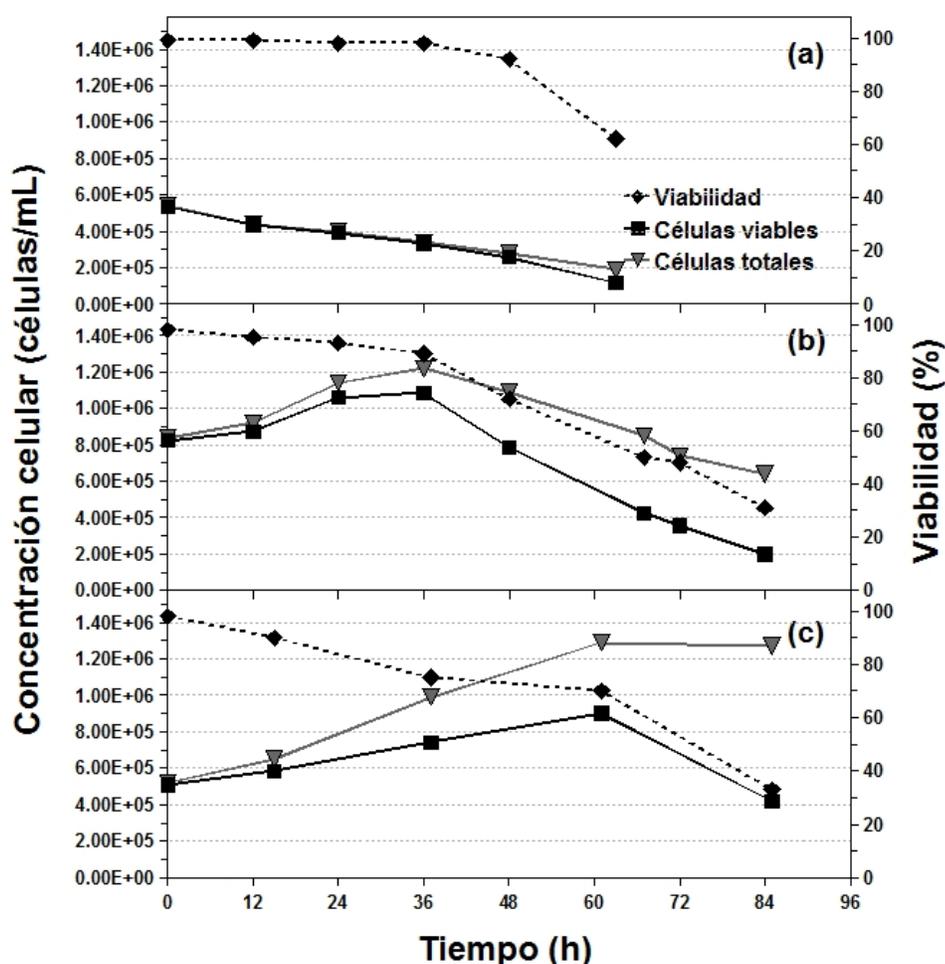


Figura 6.7. Cultivos en el sistema PFR/PFR, con células (a) y (b) Tn-4h (inoculados con  $5.35 \times 10^5$  y  $8.23 \times 10^5$  células/mL, respectivamente), y (c) H5.

#### 6.2.4. Análisis de resultados en los sistemas de doble compartimento

Estos resultados son contrarios a lo observado en el caso de los cultivos recirculados mostrados en la sección 6.2.1, aún cuando el flujo utilizado en los sistemas STR/PFR y PFR/PFR es menor. Sin embargo, se debe considerar que el diámetro interno ( $d_i$ ) de la tubería de silicón utilizada en los compartimentos PFR es de 1.6 mm, con una longitud de 21 m, comparado con el  $d_i$  de 7.9 mm y longitud de 75 cm utilizado anteriormente para las pruebas de la sección 6.2.1. Esto ocasiona que las condiciones de estrés hidrodinámico sean distintas, como se puede observar en la Tabla 6.4, los valores de  $Re < 2000$  indican que en las tuberías el flujo es laminar en todos los casos, con  $\tau_w$  en los sistemas STR/PFR y PFR/PFR de por lo menos uno y dos órdenes de magnitud superiores a los generados en el biorreactor STR recirculado.

Ramírez y Mutharasan, 1990b, reportaron que los hibridomas en cultivo son capaces de tolerar  $\tau$  de hasta  $7.2 \text{ N/m}^2$  ( $\gamma = 8000 \text{ s}^{-1}$ ). Así mismo, Palomares et al., 2000 observaron que las células de insecto Sf-9 pueden soportar hasta  $4.51 \text{ N/m}^2$  ( $\gamma = 3000 \text{ s}^{-1}$ ). En ambos casos se agregó PF-68 al medio de cultivo y las células animales fueron capaces de mantener viabilidad superior a 90 %. Ambos niveles letales de esfuerzo de corte son superiores a los que se muestran en las tablas 6.4 y 6.5 para los sistemas de cultivo discutidos en este estudio. Sin embargo, en estos trabajos las células evaluadas fueron sometidas a estrés hidrodinámico durante tiempos cortos (entre 15 y 20 min) comparados con el tiempo de duración de un cultivo de células animales, que puede estar entre las 120 y 160 h, aproximadamente.

En los cultivos en el sistema STR-loop con  $t_c$  de 278 y 76 s, las células Tn-4h estuvieron expuestas en la tubería a los esfuerzos de corte subletales de la Tabla 6.4 durante sólo 36.7 y 9.2 s, respectivamente, que son 13.2 y 12.1 % del  $t_c$  correspondiente. Esto sugiere, dada la respuesta de los cultivos en este sistema (ver sección 6.2.1), que no sólo la magnitud de los esfuerzos de corte que experimentan las células suspendidas determinará la respuesta del cultivo ante el estrés hidrodinámico, sino también el tiempo de exposición a dicho estrés y la sensibilidad de la línea celular al mismo. Además, este tipo de sistemas tiene la particularidad de someter a las células de forma intermitente a dichos esfuerzos de corte, por lo que quizá no permite a las células adaptarse a las condiciones hidrodinámicas, ya que siempre están variando en

intervalos de tiempo regulares.

Por otra parte, en los sistemas STR/PFR (con  $t_c = 227.3$  s) y PFR/PFR (con  $t_c = 692.3$  s), el tiempo de residencia ( $t_R$ ) en los compartimentos PFR (sin considerar los tubos conectores, con  $d_i = 7.9$  mm) fue de 131.9 y 324.8 s, es decir, el 58 y 47 % del  $t_c$  correspondiente. Esto significa que las células estuvieron expuestas a esfuerzos de corte mayores que en el sistema STR-loop (Tabla 6.4), durante tiempos prolongados que se aproximaron a la mitad del  $t_c$ . Sin embargo, en ambos sistemas los esfuerzos de corte fueron considerablemente inferiores a los esfuerzos de corte letales y subletales reportados para CA (Tablas 2.2 y 2.4).

Lo anterior permite suponer que aunque no existe daño mecánico aparente reflejado en la viabilidad durante las primeras 48 h de cultivo, es probable que la exposición periódica y prolongada a los esfuerzos de corte en los tres sistemas esté provocando daños no letales que se van acumulando con el tiempo de cultivo. Esto explicaría la limitación en el crecimiento celular, la reducción en la producción de SeAP en el sistema STR-loop y los cambios en el consumo de glucosa y la producción de lactato, así como la ausencia de crecimiento de las células evaluadas en los sistemas STR/PFR y PFR/PFR, ocasionando después de un tiempo la muerte del cultivo. Esta ausencia de crecimiento celular no permitió evaluar el efecto de los gradientes de OD que se lograron simular en ambos sistemas.

### **6.3. Impacto de esfuerzos de corte subletales sobre el perfil de glicosilación de SeAP producida en un sistema de CI-BV**

Como se describe en la Tabla 2.1, se sabe que las células Tn-4h de insecto tienen la capacidad de producir SeAP con glicosilación de tipo complejo, incluyendo glicanos con ácido siálico terminal (Palomares et al., 2003; Joshi et al., 2000; Joshi et al., 2001). Esta modificación postraducciona afecta a la actividad biológica de las proteínas, lo que es especialmente importante en proteínas de interés terapéutico.

Debido a las alteraciones en el metabolismo de glucosa y lactato en células Tn-4h, así como en el crecimiento celular y la producción de SeAP, ocasionadas por la exposición a los niveles subletales de esfuerzos de corte discutidos en la sección 6.2.1, surge la necesidad de determinar si el estrés provocado alteró también los patrones de

glicosilación de la PR. Entender esto adquiere relevancia ya que el estrés hidrodinámico es un factor presente en cualquier cultivo en biorreactores agitados tipo STR. Por esta razón, de los cultivos con células de insecto Tn-4h infectados descritos en la Tabla 6.6, se realizó la determinación por HPLC del perfil de glicosilación de la proteína producida bajo las tres condiciones estudiadas: Un cultivo no recirculado (sistema STR) y dos cultivos recirculados (sistema STR-loop) a 1 y 4 mL/s ( $\tau_w$  de 0.02 y 0.07 N/m<sup>2</sup>, respectivamente), para evaluar el efecto del estrés hidrodinámico en el procesamiento postraduccional de la proteína recombinante producida en un sistema de CI-BV.

Con base en el tiempo de elución de los glicanos, a su sensibilidad a la digestión con exoglicosidasas y a la diferencia de migración de los glicanos cargados al utilizar formato de amonio 25 y 250 mM, se proponen las 27 estructuras mostradas en la Tabla 6.10. Se puede observar que en los tres perfiles se encuentran casi las mismas estructuras, con diferencias notables en cuanto a la proporción según las condiciones de cultivo. Predominan las estructuras del tipo paucimanosa, altas en manosa y estructuras complejas con ácido siálico terminal, con sólo una estructura con galactosa terminal y ausencia de glicanos híbridos.

De la agrupación de los glicanos por tipo de estructura (Tabla 6.11) se puede ver que al incrementarse el esfuerzo de corte al que las células están expuestas, la proporción de estructuras de tipo complejo tiende a incrementarse, principalmente aquellas con ácido siálico terminal completamente sializadas. Así mismo, disminuye la proporción de estructuras tipo paucimanosa, mientras que la proporción de estructuras de tipo altas en manosa e híbridas permanece sin cambios notables al variar la magnitud del esfuerzo de corte. El incremento en estructuras de tipo complejo al parecer se da a expensas del decremento en estructuras de tipo paucimanosa, indicando que probablemente el estrés hidrodinámico influye disminuyendo la producción volumétrica de SeAP, lo que se refleja en un mejor proceso de edición de los glicanos. Cabe aclarar que en cultivos estáticos se ha observado hasta 20.4 % de glicanos complejos, lo que es muy similar a lo obtenido en el biorreactor sin recirculación, pero inferior a ambos cultivos recirculados.

**Tabla 6.10. Estructuras propuestas y proporción relativa (por HPLC) para N-glicanos de SeAP, producida por células Tn-4h expuestas a diferentes condiciones de estrés hidrodinámico.**

| Unidades de Glucosa | Estructura propuesta* | % del total de glicanos |  |   |
|---------------------|-----------------------|-------------------------|--|---|
|                     |                       | STR, No Recirculado     | STR-loop $t_c = 278$ s<br>$\tau_w = 0.02$ N/m <sup>2</sup> | STR-loop $t_c = 76$ s<br>$\tau_w = 0.07$ N/m <sup>2</sup> |
| 1.81                | Maltosa**             | -                       | -  | -   |
| 2.60                | MN2                   | 17.1                    | 5.0  | 8.5   |
| 3.55                | M2N2                  | 8.9                     | 8.1  | 5.3   |
| 4.03                | M2N2F                 | 9.2                     | 8.9  | 5.1   |
| 4.48                | M3N2                  | 4.3                     | 3.3  | 5.2   |
| 4.93                | M3N2F                 | 12.8                    | 7.9  | 10.1  |
| 5.45                | NM3N2F                | 4.9                     | 2.5  | 1.5   |
| 5.60                | M4N2                  | 1.6                     | 2.1  | 1.1   |
| 5.99                | N2M3N2F               | ND                      | 2.9  | 1.4   |
| 6.24                | M5N2                  | 3.2                     | 5.2  | 4.9   |
| 6.40                | M5N2                  | 1.1                     | ND   | ND  |
| 6.46                | M5N2                  | 4.1                     | ND   | ND  |
| 7.13                | M6N2                  | 7.1                     | 8.1  | 8.6   |
| 7.70                | M7N2                  | 2.2                     | 5.7  | 3.3   |
| 8.02                | M7N2                  | 2.7                     | 3.1  | 2.5   |
| 8.49                | G3N3M3N2              | 1.7                     | 2.7  | 2.0   |
| 8.73                | S2G2N2M3N2            | 0.6                     | 1.3  | 0.9   |
| 8.90                | M8N2                  | 0.6                     | 1.3  | 0.9   |
| 9.18                | S2G2N3M3N2F           | 2.3                     | 4.1  | 3.8   |
| 9.52                | M9N2                  | 0.7                     | 1.3  | 1.0   |
| 9.61                | SG3N3M3N2             | 1.3                     | 2.1  | 2.5   |
| 9.83                | SG3SN3M3N2            | 0.6                     | ND   | ND  |
| 10.23               | S2G3N3M3N2            | 2.3                     | 3.4  | 3.8   |
| 10.81               | S3G3N3M3N2            | 4.5                     | 7.5  | 8.8   |
| 11.24               | S3G3SN3M3N2           | 2.2                     | 3.5  | 5.3   |
| 11.36               | S3G3SN3M3N2           | 2.2                     | 5.0  | 6.2   |
| 11.77               | S4G4N4M3N2F           | 1.7                     | 3.8  | 5.6   |
| 12.21               | S4G4N4M3N2F           | 0.3                     | 1.0  | 1.4   |

(\*) Nomenclatura: S = Ácido Siálico, G = Galactosa, N = N-acetil glucosamina, M = Manosa, F = Fucosa. La estructura está escrita de forma que el extremo reductor está a la derecha.

(\*\*) La maltosa se añade a la muestra de glicanos antes de separar las estructuras por HPLC, como control interno.

ND = No Detectado.

En cultivos de células CHO en tanque agitado, se ha observado que manipulando el estrés hidrodinámico por medio de la agitación es posible favorecer la producción de la forma completamente glicosilada (tipo II) sobre la parcialmente glicosilada (tipo I) de la proteína recombinante activadora de plasminógeno (r-tPA, “*Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Protein*”) (Senger y Karim, 2003). Esto se realizó manipulando el Re a valores de 1870, 3720, 5590, 7460 y 9310, encontrando las

**Tabla 6.11. Distribución relativa por tipo de estructura para N-glicanos de SeAP, producida por células Tn-4h en medio TNMFH, bajo diferentes condiciones de estrés hidrodinámico.**

| Tipo de estructura                           | % del total de glicanos |   |  |
|--|-------------------------|---|--|
|  | No Recirculado          | $t_c = 278$ s<br>$\tau_w = 0.02$ N/m <sup>2</sup> | $t_c = 76$ s<br>$\tau_w = 0.07$ N/m <sup>2</sup> |
| Paucimanosas                                 | 52.2                    | 33.3  | 34.3   |
| Altas en manosa                              | 23.3                    | 27.0  | 22.4   |
| Híbridas                                     | 4.9                     | 5.5   | 2.8  |
| Complejas                                    | 19.6                    | 34.3  | 40.4   |
| Galactosa terminal                           | 1.7                     | 2.7   | 2.0  |
| Siálico terminal                             | 17.9                    | 31.6  | 38.4   |
| Sialidación parcial (sp)                     | 6.4                     | 9.6   | 10.1   |
| Sialidación completa (sc)                    | 11.5                    | 22.0  | 28.2   |
| Proporción de subgrupos con siálico terminal |                         |   |  |
| sp   | 35.7                    | 30.4  | 26.4   |
| sc   | 64.3                    | 69.6  | 73.6   |

máximas producciones volumétricas de r-tPA (ambos tipos) y de r-tPA (tipo II) cuando  $Re = 5590$ , mientras que la máxima proporción de r-tPA (tipo II) se obtuvo cuando  $Re = 9310$ , aunque con daño letal sobre las células. Estos autores también observaron incrementos de la síntesis intracelular como respuesta al estrés hidrodinámico, requiriendo el uso de glucosa, lactato, glutamina y asparagina en vías no relacionadas con la división celular.

En contraste con lo anterior, un estudio más reciente reportó que una línea de células CHO de interés industrial, al ser sometida a estrés hidrodinámico<sup>18</sup> mediante

<sup>18</sup> El estrés hidrodinámico fue aplicado en cultivos de 0.6 a 1.1 L en tanques agitados de 2 L, recirculándolos a través de lo que los autores denominaron “cámara de tortura”, formada por un dispositivo de microflujo diseñado para reducir drásticamente el diámetro de la recirculación (hasta 225  $\mu$ m, 1.5 mm y 2 mm), volver después al diámetro original y regresar el cultivo al tanque agitado, usando flujos de recirculación de 3 a 90 mL/min durante 10 días (Godoy-Silva et al., 2009).

energías de disipación de hasta  $6.4 \times 10^6 \text{ W/m}^3$ <sup>19</sup> (que en un tanque agitado equivaldría a  $\tau_{\text{máx}}$  de  $354.5 \text{ N/m}^2$ ), no se ve afectada en crecimiento, consumo de glucosa, producción de lactato ni en producción de un anticuerpo monoclonal. No obstante, estos autores sí observaron diferencias en los perfiles de N-glicosilación de los anticuerpos producidos al someter a las células a energías de disipación entre  $6.0 \times 10^4 \text{ W/m}^3$  ( $34.3 \text{ N/m}^2$ , dos órdenes de magnitud inferior al valor letal para esta línea celular) y  $6.4 \times 10^6 \text{ W/m}^3$  ( $354.5 \text{ N/m}^2$ ). Al incrementar la energía de disipación registraron en general una disminución de 80 a 55 % en estructuras biantenarias de tipo G0 (N2M3N2F), además de incrementos en estructuras complejas con galactosa terminal G1 (G1N2M3N2F) y G2 (G2N2M3N2F) de 10 a 30 % y de 1 a 5 %, respectivamente. Sin embargo, no se observó un comportamiento dosis-respuesta de la glicosilación con respecto al nivel de estrés hidrodinámico, mostrando la misma proporción de estructuras en el intervalo de energía de disipación mencionado. Además, con energías de disipación de  $1.2 \times 10^1 \text{ W/m}^3$  ( $0.5 \text{ N/m}^2$ ) y  $0.9 \times 10^2 \text{ W/m}^3$  ( $1.3 \text{ N/m}^2$ ) no hubo cambios, manteniéndose las proporciones de estructuras G0, G1 y G2 sin cambios significativos (73.3, 9.1 y 0.9 %, respectivamente) (Godoy-Silva et al., 2009).

Existen trabajos en los que se argumenta que una alta producción de proteína recombinante se refleja en un deficiente procesamiento del glicano en el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, debido a la posible “saturación” de la maquinaria enzimática de edición de los glicanos, mientras que a bajos niveles de síntesis de proteína heteróloga esto no sucedería (Palomares y Ramírez, 2002; Senger y Karim, 2003). Sin embargo, esto no está todavía debidamente documentado. Un primer acercamiento a esto sería realizar cultivos en los que la infección se realice a bajas y altas multiplicidades de infección, con lo que se podrían inducir tanto bajos como altos niveles de síntesis de proteína recombinante. Otra alternativa sería utilizar la misma MDI con diferentes baculovirus en los que el gen de interés se encuentre bajo promotores de diferente fuerza, para de esa manera evaluar el procesamiento de los glicanos a bajos y altos niveles de expresión.

---

<sup>19</sup> Este valor es varios órdenes de magnitud superior a la energía disipada en biorreactores de producción (promedio:  $10 \text{ W/m}^3$ ; inyecciones del impulsor:  $1 \times 10^3 \text{ W/m}^3$ ) (Godoy-Silva et al., 2009).

Se ha discutido también que un mecanismo de respuesta ante el estrés hidrodinámico puede involucrar la activación de integrinas en la membrana celular. Éstas pueden funcionar como sensores de estrés mecánico, cuya activación puede encender múltiples señales de transducción, como la polimerización de actina en el citoesqueleto. Se ha demostrado que esto puede modificar la organización estructural del aparato de Golgi, afectando la morfología de las cisternas y en consecuencia la organización de las enzimas que editan los N-glicanos unidos a la proteína, influyendo en su capacidad para realizar de forma adecuada esta modificación postraducciona (Godoy-Silva et al., 2009).

Se ha observado que en ciertas líneas celulares de origen animal, las condiciones subletales de estrés hidrodinámico pueden encender la producción del activador transcripcional *c-fos* en tiempos tan cortos como 1 min (Ranjan et al., 1996). Sin embargo, todavía no se comprenden del todo los mecanismos que intervienen en la respuesta celular al estrés mecánico, que incluyen entre otros a la generación de mensajeros secundarios, la activación de proteínas y la modulación de la expresión de genes. Con este antecedente, podría plantearse el estudiar si las condiciones de estrés encienden de alguna manera la síntesis o asimilación de precursores de los azúcares complejos, así como la inducción de la actividad de las enzimas que intervienen en el procesamiento de los glicanos complejos, como las N-acetil glucosaminil transferasas, galactosil transferasas y sialil transferasas; o bien, si se produce la inhibición de la actividad de hexosaminidasa (que desvía la edición del glicano hacia las paucimanas).

Este trabajo representa uno de los primeros pasos para diseñar técnicas de simulación de gradientes de oxígeno disuelto en cultivos de células animales, que permitan acercarse más a las condiciones observadas en escala de producción. Así mismo, los efectos observados en el crecimiento celular, así como en el metabolismo, la producción de proteína recombinante y sus patrones de glicosilación, serán útiles en la comprensión del efecto que los esfuerzos de corte subletales pueden tener sobre el desempeño de los cultivos de células animales.

---

---

## 7. CONCLUSIONES

- Se demostró que la capacidad de transferencia de oxígeno en biorreactores agitados, en condiciones típicas para el cultivo de células animales en escala de laboratorio, no es suficiente para la simulación de gradientes de oxígeno disuelto en sistemas de doble compartimento STR/STR. Sólo considerando el consumo de oxígeno por el cultivo y valores de  $k_{La}$  del doble o triple de los observados experimentalmente sería posible la simulación de gradientes de oxígeno disuelto de 20 a 0 %, en cultivos con tiempos de circulación de 500 s, que es aún el doble que el mayor tiempo de circulación esperado en escala de producción.
- Con los sistemas de doble compartimento STR/PFR y PFR/PFR fue posible simular gradientes de oxígeno disuelto en medio acuoso sin células, con tiempos de circulación y relaciones de volumen bien mezclado a mal mezclado cercanos a los esperados en biorreactores de escala de producción. Además, en los compartimentos PFR se estimaron esfuerzos de corte hasta 3 y 2 órdenes de magnitud inferiores a los niveles letales y subletales registrados en la literatura.
- Al evaluar los simuladores STR/PFR y PFR/PFR con células de mamífero (CHO) e insecto (Tn-4h y H5), éstas no lograron crecer, mostrando descenso en la viabilidad a partir de las 24 a 48 h de cultivo. Esto probablemente fue debido al tiempo de exposición a los esfuerzos cortantes de 0.72 y 0.58 N/m<sup>2</sup> generados en los compartimentos PFR, con tiempos de residencia en los mismos de 58 y 47 % del tiempo de circulación, respectivamente en cada sistema.
- En el sistema STR-loop, bajo condiciones de oxígeno disuelto constante no limitante de 25 %, las células de insecto Tn-4h crecieron y produjeron fosfatasa alcalina humana recombinante, soportando el estrés por esfuerzo de corte a niveles de 0.02 y 0.07 N/m<sup>2</sup> durante tiempos de residencia en el circuito de recirculación de 13.2 y 12.1 % del tiempo de circulación, respectivamente.

- En el sistema STR-loop, la exposición a esfuerzos de corte subletales al parecer ocasiona que las células de insecto Tn-4h destinen el carbono de la glucosa principalmente hacia las rutas de biosíntesis para mantener la integridad celular, en vez de utilizarlo para obtener energía. El efecto del estrés hidrodinámico se reflejó en reducciones en las velocidades de consumo de glucosa y producción de lactato, con rendimientos biomasa/glucosa mayores y lactato/glucosa inferiores a los registrados en el cultivo control sin recirculación, además de un mayor rendimiento SeAP/glucosa al incrementarse el esfuerzo de corte.
- Al aumentar el esfuerzo de corte al que las células Tn-4h fueron expuestas, la proporción de glicanos de tipo complejo se incrementó, principalmente aquellas estructuras con ácido siálico terminal completamente sializadas. Al parecer esto se llevó a cabo a expensas del decremento en la proporción de estructuras de tipo paucimanosa, debido a un mejor procesamiento postraduccional de menores cantidades de proteína recombinante producida, que probablemente no saturaron la maquinaria enzimática de edición de los glicanos en el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico.
- El tiempo de exposición de las células Tn-4h al estrés hidrodinámico parece ser, además de la magnitud del esfuerzo cortante y la sensibilidad de la línea celular, uno de los factores determinantes en la respuesta del cultivo al daño mecánico de tipo subletal. Los resultados de este trabajo muestran que la exposición intermitente a esfuerzos de corte subletales, por períodos de tiempo prolongados, podrían provocar un efecto acumulativo al transcurrir el tiempo de cultivo. Por esta razón, los niveles de esfuerzo cortante letales y subletales reportados en la literatura deben tomarse con reservas, ya que en su mayoría fueron evaluados en dispositivos como viscosímetros y tubos capilares, en los que el tiempo de exposición al estrés hidrodinámico varía entre 1 y 60 min, mientras que los cultivos de células animales pueden durar entre 120 y 336 h.

---

---

## PERSPECTIVAS

- ◆ Diseñar compartimentos PFR con tuberías de diámetro mayor a los evaluados en este trabajo, utilizando materiales con valores de  $k_L$  superiores al silicón, que permitan mejorar la desorción de oxígeno en el simulador. Así, ajustando la longitud del PFR para mantener el volumen de trabajo y usando los flujos de recirculación mencionados en las secciones anteriores, los tiempos de circulación y las relaciones de volumen bien mezclado a mal mezclado podrían mantenerse en los valores reportados aquí. De esta forma, para los mismos flujos de recirculación, los esfuerzos de corte serían menores a los reportados en el presente estudio, permitiendo el crecimiento de las células en cultivo sin comprometer la capacidad del sistema para simular gradientes de oxígeno disuelto. De esta manera se podría evaluar el efecto de gradientes de oxígeno disuelto sobre el crecimiento celular, así como en el rendimiento, producción de proteína recombinante y sus perfiles de glicosilación en cultivos de células animales.
- ◆ Evaluar de forma precisa el efecto de esfuerzos de corte subletales sobre la glicosilación de proteína recombinante, en cultivos de células animales en condiciones de oxígeno disuelto no limitante. Debido a las alteraciones observadas en el metabolismo, reflejadas en el consumo de glucosa y producción de lactato a diferentes niveles de esfuerzo de corte, sería interesante complementar estos experimentos con una evaluación detallada del consumo de las fuentes de carbono en el medio, así como en la producción de metabolitos. Una alternativa para realizar esto sería utilizar el sistema STR/loop descrito en el presente trabajo, en el que sólo probando diferentes combinaciones de flujo de recirculación, diámetro y longitud del tubo, se podrían estudiar diferentes niveles de esfuerzo de corte a distintos tiempos de residencia, manteniendo constante el volumen de trabajo. Otra forma podría ser estudiar diferentes niveles de estrés hidrodinámico en tanques agitados, variando la velocidad de agitación para obtener diferentes niveles de esfuerzo de corte y observar su efecto sobre la glicosilación de proteína recombinante.

- ◆ Estudiar detenidamente la posibilidad de que a menores rendimientos de proteína recombinante se pueda obtener un mejor procesamiento de los glicanos en la proteína recombinante. Como primer acercamiento se podrían realizar cultivos de células de insecto a bajas y altas multiplicidades de infección, con lo que se podrían inducir tanto bajos como altos rendimientos de proteína recombinante. Otra alternativa sería utilizar la misma multiplicidad de infección con diferentes baculovirus en los que el gen de interés se encuentre bajo promotores de diferente fuerza, para de esa manera evaluar el procesamiento de los glicanos a bajos y altos niveles de expresión y producción de proteína recombinante.
- ◆ Estudiar si las condiciones de estrés hidrodinámico afectan la síntesis o asimilación de precursores de los azúcares complejos, así como la inducción de la actividad de las enzimas que intervienen en el procesamiento de los glicanos complejos, como las N-acetil glucosaminil transferasas, galactosil transferasas y sialil transferasas; o bien, si se produce la inhibición de la actividad de hexosaminidasas (que desvía la edición del glicano hacia las paucimanosas).

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Reesh, I., Kargi, F. 1989. Biological responses of hybridoma cells to defined hydrodynamic shear stress. *J. Biotechnol.* 9: 167-178.
- Agathos, S.N. 1996. Insect cell bioreactors. *Cytotechnol.* 20: 173-189.
- Ailor, E., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Masuda, K., Rahman, B.A., Jarvis, D.L., Lee, Y.C., Betenbaugh, M.J. 2000. N-glycan patterns of human transferrin produced in *Trichoplusia ni* insect cells: effects of mammalian galactosyltransferase. *Glycobiol.* 10: 837-847.
- Al-Rubeai, M., Singh, R.P., Goldman, M.H., Emery, A.N. 1995. Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol. Bioeng.* 45: 463-472.
- Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glössl, J., März, L. 1995. Insect cells contain an unusual, membrane bound  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. *J. Biol. Chem.* 270: 17344-17349.
- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B.H., März, L. 1999. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj. J.* 16: 109-123.
- Arroniz, R.I. 2003. Efecto de la tensión de oxígeno disuelto constante en la producción de lactadherina recombinante expresada en el sistema células de insecto-baculovirus. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología - UNAM.
- Augenstein, D.C., Sinskey, A.J., Wang, D.I.C. 1971. Effect of shear on the death of two strains of mammalian tissue cells. *Biotechnol. Bioeng.* 13: 409-418.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F. 1977. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill.
- Betenbaugh, M., Ailor, E., Whiteley, E.M., Tsu-An-Hsu. 1999. Insect cells and larvae, gene expression systems. En: *Encyclopedia of Bioprocess Technology Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. Wiley Biotechnology Encyclopedias. Páginas 1457-1476.

- Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N. 1960. Velocity Distributions in Laminar Flow. En: Transport Phenomena. John Wiley. New York. Páginas 34-70.
- Boulton-Stone, G.M., Blake, G.R. 1993. Gas bubbles bursting at a free surface. *J. Fluid. Mech.* 154: 437-466.
- Brakemeier, S., Eichler, I., Hopp, H., Kohler, R., Hoyer, J. 2002. Up-regulation of endothelial stretch-activated cation channels by fluid shear stress. *Cardiovasc. Res.* 53: 209-218.
- Cala, S.E. 2000. GRP94 hyperglycosylation and phosphorylation in Sf21 cells. *Bioch. Biophys. Acta.* 1496: 296-310.
- Chazenbalk, G.D., Rapoport, B. 1995. Expression of the extracellular domain of the Thyrotropin Receptor in the baculovirus system using a promoter active earlier than the polyhedrin promoter. *The J. of Biol. Chem.* 270: 1543-1549.
- Cherry, R.S., Kwon, K.Y. 1990. Transient shear stresses on a suspension cell in turbulence. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 563-571.
- Chisti, Y. 2000. Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Tibtech.* 18: 420-432.
- Chittur, K.K., McIntire, L.V., Rich, R.R. 1988. Shear stress effects on human T cell function. *Biotechnol. Prog.* 4: 89-96.
- Cosgrove, L., Lovrecz, G.O., Verkuylen, A., Cavaleri, L., Black, L.A., Bentley, J.D., Howlet, G.J., Gray, P.P., Ward, C.W., y McKern, N.M. 1995. Purification and properties of Insulin Receptor Ectodomain from large-scale mammalian cell culture. *Prot. Expr. Purif.* 6: 789-798.
- Davidson, D.J., Castellino, F.J. 1991. Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line (IZD-MBO503). *Biochem.* 30: 6689-6696.
- Davidson, D.J., Fraser, M.J., Castellino, F.J. 1990. Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells. *Biochem.* 29: 5584-5590.

- Davis, T.R., Munkenbeck, K., Granados, R.R., Wood, H.A. 1992. Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion. *Biotechnol.* 10: 148-150.
- Davis, T.R., Shuler, M.L., Granados, R.R. y Wood, H.A. 1993. Comparison of oligosaccharide processing among various insect cell lines expressing a secreted glycoprotein. *In Vivo Cell. Dev. Biol.* 29A: 842-846.
- Davis, T.R., Wood, H.A. 1995. Intrinsic glycosylation potential of insect cell cultures and insect larvae. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31: 659-663.
- Day, D., Emery, A.N. 1999. Problems in predicting cell damage from bubble bursting. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 240-245.
- Dewitz, T.S., McIntire, L.V., Martin, R.R. 1980. Alteration of human leukocyte chemotaxis, chemiluminescence, and HMP shunt activity caused by mechanical trauma. *Artif. Organs.* 4: 311-317.
- Diamond, S.L., Eskin, S.G., McIntire, L.V. 1989. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Sci.* 243: 1483-1485.
- Donaldson, M., Wood, H.A., Kulakosky, P.C. 1999. Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* 63: 255-262.
- Garcia-Briones, M.A., Brodkey, R.S., Chalmers, J.J. 1994. Computer simulations of the rupture of a gas bubble at a gas-liquid interface and its implications in animal cell damage. *Chem. Eng. Sci.* 49: 2301-2320.
- Garcia-Briones, M.A., Chalmers, J.J. 1994. Flow parameters associated with hydrodynamic cell injury. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 1089-1098.
- Gawlitzeck, M., Valley, U., Wagner, R. 1998. Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 518-528.

- Godoy-Silva, R., Chalmers, J.J., Casnocha, S.A., Bass, L.A., Ma, N. 2009. Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnol. Bioeng.* 103: 1103-1117.
- Goldblum, S., Bae, Y., Hink, W.F., Chalmers, J.J. 1990. Protective effect of methylcellulose and other polymers on insect cells subjected to laminar shear stress. *Biotechnol. Prog.* 6: 383-390.
- Gooch, K.J., Kwon, J.H., Blunk, T., Langer, R., Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G. 2001. Effects of mixing intensity on tissue-engineered cartilage. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 402-407.
- Gooche, C.F., Gramer, M.J., Andersen, D.C., Bahr, J.B. y Rasmussen, J.R. 1991. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Bio/Technol.* 9: 1347-1355.
- Gooche, C.F., Monica, T. 1990. Environmental effects on protein glycosylation. *Biotechnol. Rev.* 8: 421-427.
- Griffiths, B. 1991. Cultural revolutions. *Chemistry and Industry.* 16: 682-684.
- Griffiths, J.B. 1992. Animal cell culture processes - batch or continuous?. *J. Biotechnol.* 22: 21-30.
- Gudi, S.R.P., Clark, C.B., Frangos, J.A. 1996. Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ. Res.* 79: 834-839.
- Guile, G.R., Rudd, P.M., Wing, D.R., Prime, S.B., Dwek, R. 1996. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal. Biochem.* 240: 210-226.
- Horiuchi, T., Marumoto, Y., Saeki, Y., Sato, Y., Furusawa, M., Konda, A., Maeda, S. 1987. High level expression of the human  $\alpha$ -interferon gene through the use of an improved baculovirus vector in the silk worm *Bombyx mori*. *Agric. Biol.*

Chem. 51: 1573-1580.

- Hsu, T.A., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Kato, K., Shimada, I., Masuda, K., Whiteley, E.M., Fan, J.Q., Lee, Y.C., Betenbaugh, M.J. 1997. Differential N-glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070.
- Hu, W.S., Aunins, J.G. 1997. Large-scale mammalian cell culture. *Curr. Op. Biotech.* 8: 148-153.
- Hu, W.S., Wang, D.I.C. 1986. Mammalian cell culture technology: A review from an engineering perspective. En: *Mammalian cell technology*. Butterworths, Boston, MA. Páginas 167-177.
- Jarvis, D.L., Finn, E.E. 1995. Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells. *Virology* 212: 500-511.
- Jem, J.K., Fateen, S., Michaels, J. 1994. Mixing phenomena in industrial bioreactors with perfusion spin filters. En: *Animal Cell Technology: Products of Today, Prospects for Tomorrow*. Butterworth Heinemann, Oxford, UK. Páginas 392-396.
- Jenkins, N., Shah, P.M. 1999. Protein glycosylation. En: *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. Wiley Biotechnology Encyclopedias. Páginas 2169-2178.
- Joshi, J., Elias, C., Patole, M. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Biochem. Eng. J.* 62: 121-141.
- Joshi, L., Davis, T.R., Mattu, T.S., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Shuler, M.L., Wood, H.A. 2000. Influence of baculovirus-host cell interactions on complex N-linked glycosylation of a recombinant human protein. *Biotechnol. Prog.* 16: 650-656.
- Joshi, L., Shuler, M.L., Wood, H.A. 2001. Production of a sialylated N-linked glycoprotein in insect cells. *Biotechnol. Prog.* 17: 822-827.
- 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. *Biotechnol. Bioeng.* 50: 36-48.
- Keane, J.T., Ryan, D., Gray, P.P. 2003. Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 211-220.
- Kolmogorov, A.N. 1941. On degeneration of isotropic turbulence in an incompressible viscous liquid. En: *Turbulence: Clasic Papers on Statistical Theory*. New York, Interscience Publishers. Páginas 538-540.
- Kretzmer, G., Schugerl, K. 1991. Response of mammalian cells to shear stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 613-516.
- Kunkel, J.P., Jan, D.C.H., Jamieson, J.C., Butler, M. 1998. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J. Biotech.* 62: 55-71.
- Leudeking, R., Piret, E.L. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1: 393-412.
- Licari, P., Bailey, J.E. 1991. Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: multiplicity of infection and intracellular protein degradation. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 238-246.
- Lindberg, I., Shaw, E., Finley, J., Leone, D., Deiniger, P. 1991. Posttranslational modifications of Rat Proenkephalin overexpressed in chinese hamster ovary cells. *Endocrinol.* 128: 1849-1856.
- Lindsay, D., Betenbaugh, M. 1992. Quantification of cell culture factors affecting recombinant protein yields in baculovirus-infected insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 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. *Biotechnol. Let.* 9: 691-696.
- Luckow, V.A., Summers, M.D. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technol.* 6: 47-55.

- Ludwig, A., Tomczkowski, J., Kretzmer, G. 1992. Influence of shear stress on adherent mammalian cells during division. *Biotechnol. Lett.* 14: 881-884.
- Ma, N., Koelling, K.W., Chalmers, J.J. 2002. Fabrication and use of a transient contractional flow device to quantify the sensitivity of mammalian and insect cells to hydrodynamic forces. *Biotechnol. Bioeng.* 80: 428-437.
- Mardikar, S.H., Nirajan, K. 2000. Observations on the shear damage to different animal cells in a concentric cylinder viscometer. *Biotechnol. Bioeng.* 68: 697-704.
- McQueen, A., Bailey, J.E. 1989. Influence of serum level, cell line, flow type and viscosity on flow-induced lysis of suspended mammalian cells. *Biotechnol. Lett.* 11: 531-536.
- McQueen, A., Meilhoc, E., Bailey, J.E. 1987. Flow effects on the viability and lysis of suspended mammalian cells. *Biotechnol. Lett.* 9: 831-836.
- Meij, P., Vervoort, M.B., Meijer, C.J., Bloemena, E., Middeldorp, J.M. 2000. Production, monitoring and purification of EBV encoded latent membrane protein 1 expressed and secreted by recombinant baculovirus infected insect cells. *J. Virol. Methods.* 90: 193-204.
- Mena, J.A., Ramírez, O.T., Palomares, L.A. 2003. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *BioTech.* 34: 260-264.
- Misenheimer, T.M., Huwiler, K.G., Annis, D.S., Mosher, D.F. 2000. Physical characterization of the procollagen module of human thrombospondin 1 expressed in insect cells. *J. Biol. Chem.* 275: 40938-40945.
- Nguyen, B., Jarnagin, K., Williams, S., Chan, H., Barnett, J. 1993. Fed-batch culture of insect cells: Method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. *J. Biotechnol.* 31: 205-217.
- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. 2003a. Mass Transfer. En: *Bioreaction Engineering Principles*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, Boston,

- Dordrecht, London, Moscow. Páginas 423-475.
- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. 2003b. Scale-up of Bioprocesses. En: *Bioreaction Engineering Principles*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. Páginas 477-518.
- Nienow, A.W., Langheinrich, C., Stevenson, N.C., Emery, A.N., Clayton, T.M., Slater, N.K.H. 1996. Homogenization and oxygen transfer rates in large agitated and sparged animal cell bioreactors: Some implications for growth and production. *Cytotechnol.* 22: 87-94.
- Nollert, M.U., Diamond, S.L., McIntire, L.V. 1991. Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 588-602.
- O' Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. 1994. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Ed. Oxford University Press, Nueva York.
- Ogonah, O.W., Freedman, R.B., Jenkins, N., Patel, K., Rooney, B.C. 1996. Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex N-linked glycosylation on recombinant proteins. *Bio/Technol.* 14: 197-202.
- Oh, S.K.W., Nienow, A.W., Al-Rubeai, M., Emery, A.N. 1989. The effects of agitation intensity with and without continuous sparging on the growth and antibody production of hybridoma cells. *J. Biotechnol.* 12: 45-62.
- Oosterhuis, N.M.G., Kossen, N.W.F. 1984. Dissolved oxygen concentration profiles in a production scale bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 546-550.
- Page, M., Sydenham, M.A. 1991. High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath-1H in chinese hamster ovary cells. *BioTechnol.* 9: 64-68.
- 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, Instituto de Biotecnología - UNAM.
- Palomares, L.A., Estrada, S., Ramírez, O.T. 2006. Principles and applications of the insect cell-baculovirus expression vector system. En: *Cell culture technology*

- for pharmaceutical and cellular applications. Marcel Dekker Inc., New York. Páginas 627-692.
- Palomares, L.A., González, M., Ramírez, O.T. 2000. Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production. *Enz. Micr. Technol.* 26: 324-331.
- Palomares, L.A., Joosten, C.E., Hughes, P.R., Granados, R.R., Shuler, M.L. 2003. A novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnol. Prog.* 19: 185-192.
- Palomares, L.A., Ramírez, O.T. 1996. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnol.* 22: 225-237.
- Palomares, L.A., Ramírez, O.T. 2000a. Bioreactor scale-down. En: *Encyclopedia of Cell Technology*. Wiley Biotechnology Encyclopedias. Páginas 175-183.
- Palomares, L.A., Ramírez, O.T. 2000b. Bioreactor scale-up. En: *Encyclopedia of Cell Technology*. Wiley Biotechnology Encyclopedias. Páginas 183-200.
- Palomares, L.A., Ramírez, O.T. 2002. Complex N-glycosylation of recombinant proteins by insect cells. *Bioproc.* 1: 70-73.
- Perry, R.H., Green, D.W., Maloney, J.O. 1992. Perry, *Manual del Ingeniero Químico*. Tomo I. Sexta Edición (Tercera Edición en Español). McGRAW-HILL. página 3-126.
- Petersen, J.F., McIntire, L.V., Papoutsakis, E.T. 1988. Shear sensitivity of cultured hybridoma cells (CRL-80-18) depends on mode of growth, culture age and metabolite concentration. *J. Biotechnol.* 7: 229-246.
- Prokop, A., Bajpai, R. 1992. The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. *Advances Appl. Microbiol.* 37: 165-232.
- Radford, K.M., Cavegn, C., Bertrand, M., Bernard, A.R., Reid, S., Greenfield, P.F. 1997. The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: secreted and non-secreted products. *Cytotechnol.* 24: 73-81.

- Ramírez, O.T., Mutharasan, R. 1990a. Cell cycle and growth phase dependent variations in size distribution, antibody productivity and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 839-848.
- Ramírez, O.T., Mutharasan, R. 1990b. The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 911-920.
- Ranjan, V., Waterbury, R., Xiao, Z., Diamond, S.L. 1996. Fluid shear stress induction of the transcriptional activator c-fos in human and bovine cells, HeLa and Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 383-390.
- Rankl, N.B., Rice, J.W., Gurganus, T.M., Barbee, J.L., Burns, D.J. 1994. The production of an active Protein Kinase C- $\delta$  in insect cells is greatly enhanced by the use of the basic protein promoter. *Protein Express. Purif.* 5: 346-356.
- Rhiel, M., Mitchell-Logean, C.M., Murhammer, D.W. 1997. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High five<sup>TM</sup>) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 909-920.
- Riadh, M., Padh, H. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr. Sci.* 80: 1121-1128.
- Roy, P., French, T., Erasmus, B. 1992. Protective efficacy of virus-like particles for blue tongue disease. *Vacc.* 10: 28-32.
- Sandoval, E.A. 2003. Efecto de gradientes de oxígeno disuelto sobre el metabolismo aerobio-anaerobio y producción de Trp-LE proinsulina por *Escherichia coli* recombinante, en estudios de escalamiento descendente. Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología - UNAM.
- Schurch, U., Kramer, H., Einsele, A., Widmer, F., Eppenberger, H.M. 1988. Experimental evaluation of laminar shear stress on the behaviour of hybridoma mass cell cultures, producing monoclonal antibodies against mitochondrial creatine kinase. *J. Biotechnol.* 7: 179-184.

- 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. *Enz. Microb. Technol.* 14: 798-804.
- Senger, R.S, Karim, M.N. 2003. Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. *Biotechnol. Prog.* 19: 1199-1209.
- Serrato, J.A. 2002. Estudio de escalamiento descendente en el proceso de producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología - UNAM.
- Serrato, J.A., Hernández, V., Estrada-Mondaca, S., Palomares, L.A., Ramírez, O.T. 2007. Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 47: 113-124.
- Serrato, J.A., Palomares, L.A., Meneses-Acosta, A., Ramírez, O.T. 2004. Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 88: 176-188.
- Smith, C.G., Greenfield, P.F., Randerson, D.H. 1987. A technique for determining the shear sensitivity of mammalian cells in suspension culture. *Biotechnol. Technol.* 1: 39-44.
- Smith, G., Summers, M., Fraser, M. 1983a. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165.
- Smith, G.E., Summers, M.D., Fraser, M.J. 1983b. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: Deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.* 46: 584-593.
- Sweere, A.P.J., Luyben, K.C.A.M., Kossen, N.W.F. 1987. Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 386-398.

- Takahashi, N., Tomiya, N. 1992. Analysis of N-linked oligosaccharides: application of glycoamidase A. En: Handbook of endoglycosidases and glycoamidases. Boca Raton, FL: CRC Press. Páginas 199- 332.
- Taticek, R.A., Choi, C., Phan, S-E., Palomares, L.A., Shuler, M.L. 2001. Comparison of growth and recombinant protein expression in two different insect cell lines in attached and suspension culture. *Biotechnol. Prog.* 17: 676-684.
- Thomas, C. 1990. Problems of shear in biotechnology. En: *Chem. Eng. Problems Biotechnol.* Elsevier Sci. Pub., England. Páginas 25-93.
- Thorens, B. y Vassalli, P. 1986. Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without affecting secretion. *Nature.* 321: 618-620.
- Tramper, J. 1995. Oxygen gradients in animal-cell bioreactors. *Cytotechnol.* 18: 27-34.
- Tramper, J., Vlak, J.M., Gooijer, C.D. 1996a. Oxygen gradients in small and big sparged insect-cell bioreactors. *Cytotechnol.* 20: 231-238.
- Tramper, J., Vlak, J.M., Gooijer, C.D. 1996b. Scale-up aspects of sparged insect-cell bioreactors. *Cytotechnol.* 20: 221-229.
- Tramper, J., Williams, J.B., Joustra, D., Vlak, J.M. 1986. Shear sensitivity of insect cells in suspensio. *Enz. Microb. Technol.* 8: 33-36.
- Trujillo-Roldán, M.A., Valdéz-Cruz, N.A. 2006. El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Rev. Lat. Micr.* 48: 269-280.
- van Lier, F., van Duijnhoven, G., de Vaan, M., Vlak, J., Tramper, J. 1994. Continuous  $\beta$ -galactosidase production in insect cells with a p10 gene based baculovirus vector in two stage bioreactor system. *Biotechnol. Prog.* 10: 60-64.
- Varley, J., Birch, J. 1999. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnol.* 29: 177-205.
- Wagner, R., Geyer, H., Geyer, R., Klenk, H-D. 1996. N-acetyl-b-glucosaminidase accounts for differences in glycosylation of influenza virus hemagglutinin

- expressed in insect cells from baculovirus vector. *J. Virol.* 70: 4103-4109.
- Werner, R.G., Walz, F., Noé, W., y Konrad, A. 1992. Safety and economic aspects of continuous mammalian cell culture. *J. Biotechnol.* 22: 51-68.
- Wernersson, E.S., Tragardh, C. 1999. Scale-up of Rusthon turbine-agitated tanks. *Chem. Eng. Sci.* 54: 4245-4256.
- Wirth, M., Bode, J., Zettlmeissl, G., Hauser, H. 1988. Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure. *Gene.* 73: 419-426.
- Wu, J., Daugulis, A.J., Faulkner, P., Goosen, M.F.A. 1995. Protective effects of polymer additives on animal cells exposed to rapidly falling liquid films. *Biotechnol. Prog.* 11: 127-132.
- Wu, J., Ruan, Q., Lam, H.Y.P. 1997. Effects of surface-active medium additives on insect cell surface hydrophobicity relating to cell protection against bubble damage. *Enz. Microb. Technol.* 21: 341-348.
- 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. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 636-641.
- Yang, M., Butler, M. 2000. Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. *Biotechnol. Prog.* 16: 751-759.
- Zanghi, J.A., Schmelzer, A.E., Mendoza, T.P., Knop, R.H., Miller, W.M. 1999. Bicarbonate concentration and osmolarity are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO<sub>2</sub> or pH. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 182-191.
- Zhang, F., Saarinen, M.A., Itle, L.J., Lang, S.C., Murhammer, D.W., Linhardt, R.J. 2002. The effect of dissolved oxygen (DO) concentration on the glycosylation of recombinant protein produced by the insect cell-baculovirus expression system. *Biotechnol. Bioeng.* 77: 219-224.
- 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. *J. Biotechnol.* 33: 249-258.

Zhang, Z., Al-Rubeai, M., Thomas, C.R. 1993. Estimation of disruption of animal cells by turbulent capillary flow. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 987-993.

Zhou, G., Kresta, S.M. 1996. Impact of tank geometry on the maximum turbulence energy dissipation rate for impellers. *AIChE. J.* 42: 2476-2490.