



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

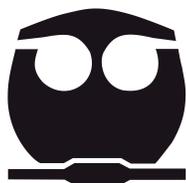
**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES SINCRONIZADAS
COMO ESTRATEGIA PARA EL ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

PRESENTA

JOCELYNE ELENA MENDOZA PÉREZ



MÉXICO, D.F.

Septiembre 2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: María Eugenia Torres Marquéz**

VOCAL: **Profesor: Patricia Elvira Berrón Ruiz**

SECRETARIO: **Profesor: José Antonio Serrato Pérez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: José Pedraza Chaverri**

2° SUPLENTE: **Profesor: José Ignacio Paramo Ramírez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSIO VILLEGAS

ASESOR DEL TEMA: DR EN C. JOSÉ ANTONIO SERRATO PÉREZ

SUSTENTANTE (S): JOCELYNE ELENA MENDOZA PÉREZ

Índice General

Índice de Figuras	I
Índice de Tablas	III
Abreviaturas	IV
Resumen	VII
Introducción	IX
1. Antecedentes	1
1.1 Ciclo celular	1
1.2 Sincronización celular	2
1.3 Elutriación Centrífuga a contracorriente	4
1.3.1 Principio de operación	4
1.3.2 Fundamento matemático de la elutriación centrífuga a contracorriente.	6
1.3.3 Elutriación centrífuga como método de sincronización en las diferentes fases del ciclo celular	8
1.4 Cultivo de células animales en Biorreactores	10
2. Hipótesis	12
3. Justificación	12
4. Objetivos	13
5. Materiales y Métodos	14
5.1 Modelos Biológicos	14
5.2 Medios de cultivo	14
5.3 Mantenimiento celular	15
5.4 Cultivos celulares	16
5.4.1 Cultivo en Frascos T	16
5.4.2 Cultivos en Minibiorreactor	16

5.4.2.1 Adecuación y adaptación de puertos de adición y adquisición de muestra, electrodos, mangueras y filtros	17
5.4.2.2 Software my-Control y BioXpert V.2 (Applikon Biotechnology)	17
5.4.2.3 Calibración electrodo pH	18
5.4.2.4 Lavado y esterilización de Minibiorreactor	18
5.4.2.5 Calibración del electrodo de oxígeno disuelto (OD)	18
5.4.2.6 Preparación inoculo	18
5.4.2.7 Muestreo	19
5.4.2.8 Control de los parámetros de cultivo	19
5.4.3 Concentración y viabilidad celular	19
5.5 Determinación de tamaño celular relativo	20
5.6 Cinéticas de crecimiento celular	20
5.7 Sistema de Elutriación Centrífuga a contracorriente	21
5.7.1 Ultracentrífuga, Rotor y cámara de elutriación	21
5.7.2 Bomba peristáltica MiniPuls 3 (Gilson)	22
5.7.2.1 Curvas de calibración de la bomba peristáltica	22
5.7.3 Procedimiento general de Elutriación Centrífuga	23
5.7.3.1 Obtención de la población celular en la fase G1 del ciclo celular	24
5.7.3.2 Inyección de células no sincronizadas al sistema de elutriación para la caracterización de sistema	24
5.7.3.3 Inyección directa de células no sincronizadas al sistema de elutriación mediante una inyección hidrodinámica para obtener una población en la fase G1 del ciclo celular	24
5.7.3.4 Evaluación de la sincronía	25
5.7.3.5 Barrido de ciclo celular	25

5.8 Determinación del contenido de DNA por citometría de flujo	26
5.8.1 Estandarización del sistema	26
5.8.2 Fijación celular	26
5.8.3 Tinción de DNA	27
5.8.4 Lectura en citómetro FACS Calibur	27
5.9 Cuantificación de la concentración de Glucosa, Lactato y L-Glutamina	27
5.10 Consideraciones matemáticas	28
5.10.1 Velocidad específica de crecimiento	28
5.10.2 Velocidad de rotor JE-6B y flujos para colecta de fracciones	28
5.11 Análisis estadístico de los datos	29
5.12 Reactivos	32
5.12.1 PBS 10X	32
5.12.2 Azul tripano	32
5.12.3 L-Glutamina 200 mM	32
5.12.4 Yoduro de propidio 1 mg mL ⁻¹	32
5.12.5 RNAasa 10 mg mL ⁻¹	33
6. Resultados y Discusiones	34
6.1 Caracterización de las líneas celulares	34
6.1.1 Cinética de crecimiento celular en minibiorreactor de un cultivo no sincronizado de células de Hibridoma murino BCF2 y células CHO-DG44	34
6.1.2 Determinación de diámetro celular	36

6.2 Implementación del sistema de cultivo de células sincronizadas en minibiorreactores	38
6.2.1 Montaje	38
6.2.2 Caracterización del sistema fluido	40
6.2.3 Cálculo teórico del diámetro de las células CHO-DG44 y BCF2 que se pueden separar a diferentes flujos de fluido empleando la ley de Stokes simplificada	42
6.2.4 Determinación y Evaluación de las condiciones de sincronización del sistema de Elutriación Centrífuga acoplado a un minibiorreactor instrumentado	43
6.2.4.1 Separación de células de Hibridoma Murino BCF2 sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular	44
6.2.4.2 Separación de células CHO-DG44 sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular	47
6.2.4.3. Evaluación del rendimiento de las separaciones empleando células BCF2 y CHO-DG44	49
6.3 Evaluación de la pureza de una población sincronizada en la fase G1 de células BCF2 y CHO-DG44	52
6.4 Cinéticas de ciclo celular en minibiorreactor de una población sincronizada de Hibridomas BCF2 en la fase G1 del ciclo celular	53
7. Conclusiones	59
8. Perspectivas	60
9. Anexos	61
9. 1 Anexo I Barridos (separaciones) de células de Hibridoma Murino BCF2	61
9.2 Anexo II Barridos (separaciones) de células CHO-DG44	64

Índice de Figuras

- Figura 1.** Proceso de elutriación centrífuga
- Figura 2.** Correlación entre tamaño celular y contenido de DNA determinado en un cultivo de células MEL.
- Figura 3.** Sistema de elutriación centrífuga a contracorriente.
- Figura 4.** Cámara de elutriación estándar.
- Figura 5.** Nomograma empleado para estimar las velocidad del rotor JE-6B.
- Figura 6.** Control de las variables de un cultivo en minibiorreactor a través del software BioXpert V.2.
- Figura 7.** Cinética de crecimiento en minibiorreactor instrumentado Applikon de 500 mL.
- Figura 8.** Histograma de distribución de diámetro celular.
- Figura 9.** Esquema de sistema de cultivo de células sincronizadas.
- Figura 10 .** Curvas de calibración de bomba peristáltica Minipuls 3.
- Figura 11.** Poblaciones celulares en las diferentes fases de ciclo celular de células de Hibridoma murino BCF2 obtenidas a 1500 RPM.
- Figura 12.** Análisis de ciclo celular de las fracciones colectadas en la separación a 1500 RPM de células de Hibridoma Murino BCF2.
- Figura 13.** Poblaciones celulares en las diferentes fases de ciclo de células de CHO-DG44 separadas a 1500 RPM.
- Figura 14.** Análisis de contenido de DNA por citometría de una población no sincronizada y una población sincronizada.
- Figura 15.** Cultivo de células BCF2 sincronizada en la fase G1 del ciclo celular.
- Figura 16.** Control de las variables de un cultivo en minibiorreactor de un cultivo de células BCF2 sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular
- Figura 17.** Cultivo de células BCF2 sincronizadas en la fase G1 de ciclo celular
- Figura 18.** Control de las variables de un cultivo en minibiorreactor de un cultivo de células BCF2 sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular.
- Figura 19.** Barrido del contenido de DNA de células de Hibridoma murino BCF2 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1000 RPM.

Figura 20. Barrido del contenido de DNA de células de Hibridoma murino BCF2 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 2000 RPM.

Figura 21. Barrido del contenido de DNA de células CHO-DG44 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1500 RPM. El barrido se realizó con 306×10^6 de células a 28 °C.

Figura 22. Barrido del contenido de DNA de células CHO-DG44 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1500 RPM. El barrido se realizó con 71×10^6 de células a 28 °C.

Figura 23. Barrido del contenido de DNA de células CHO-DG44 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1000 RPM. El barrido se realizó con 116×10^6 de células a 28 °C.

Figura 24. Barrido del contenido de DNA de células CHO-DG44 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1500 RPM. El barrido se realizó con 546×10^6 de células a 28 °C.

Índice de Tablas

- Tabla 1.** Datos cinéticos de la líneas celulares BCF2 y CHO-DG44 crecidas en minibiorreactor Applikon de 500 mL.
- Tabla 2.** Diámetros obtenidos en las diferentes velocidades de fuerza centrífuga
- Tabla 3.** Flujos y Diámetros determinados para obtener poblaciones de células BCF2 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.
- Tabla 4.** Flujos y Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular
- Tabla 5.** Rendimiento celular obtenido después de emplear el sistema de elutriación centrífuga acoplado a un minibiorreactor instrumentado en células BCF2 y CHO-DG4.
- Tabla 6.** Análisis de contenido de DNA y células recuperadas en cada una de las fracciones elutriadas a 1500 RPM de la inyección de 5.46×10^8 células CHO-DG44
- Tabla 7.** Análisis de contenido de DNA de una población heterogénea y una población homogénea empleando el modelo matemático Dean-Jett-Fox y Watson Pragmático
- Tabla 8.** Diámetros determinados para obtener poblaciones de células BCF2 a 1000 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.
- Tabla 9.** Diámetros determinados para obtener poblaciones de células BCF2 a 2000 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.
- Tabla 10.** Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.
- Tabla 11.** Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.
- Tabla 12.** Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1000 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.
- Tabla 13.** Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.

Abreviaturas

A	Área de la sección transversal de la cámara de elutriación
AcM	Anticuerpo Monoclonal
°C	Grados centígrados
BrdU	Bromodesoxiuridina
cel.	Célula
cm ²	Centímetros cuadrados
CO ₂	Bióxido de carbono
CV	Coefficiente de variación
D	Constante de control Derivativa
d	Diámetro
DMEM	Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F	Fuerza de Arrastre; Flujo
FSC	Dispersión de luz frontal
g	Gramo
G1	gap 1
G2	gap 2
G	Velocidad de giro
H	Horas
I	Integral
ID	Diámetro interno
IgG	Inmunoglobulina de clase G
KCl	Cloruro de calcio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
L	Litro
Ln	Logaritmo natural
M	Concentración molar; Mitosis
min	Minuto

μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Concentración miliMolar
μm	Micrómetro
mm	Milímetro
N_2	Nitrógeno
H	Hora
NaCl	Cloruro de sodio
Na_2HPO_4	Fosfato di-básico de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
No.	Número
O_2	Oxígeno
OD	Oxígeno disuelto
P	Proporcional
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
R	Coefficiente de correlación lineal
r	Radio
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Revoluciones por minuto
S	Síntesis
SD	Desviación estándar
SFB	Suero Fetal Bovino
SSC	Dispersión de luz lateral
t	Tiempo
td	Tiempo de duplicación
% V	Porcentaje de viabilidad
V	Volumen; Velocidad de flujo de fluido
V_s	Velocidad de sedimentación
X	Constante de la cámara de elutriación; Concentración celular final
X_o	Concentración celular inicial

X_t	Células totales
X_v	Células vivas

SIMBOLOS GRIEGOS

h	Viscosidad
μ	Velocidad específica de crecimiento
ρ_m	Densidad de fluido
ρ_p	Densidad de partícula
ω	Velocidad angular

Resumen

El cultivo de células animales en biorreactores representa hoy día la tecnología estándar para la producción de un número importante de proteínas terapéuticas. No obstante, se requiere aun de más investigación para conseguir optimizar tanto la cantidad como la calidad de las proteínas recombinantes producidas. En el presente trabajo se desarrolló y caracterizó un sistema de cultivo de células animales sincronizadas en minibiorreactores para realizar cultivos homogéneos con respecto al ciclo celular de la población y bajo condiciones de cultivo controladas. Dicho sistema permitirá realizar estudios detallados, en las diferentes fases del ciclo celular, de la contribución de los múltiples procesos fisiológicos y metabólicos celulares implicados en la producción de proteínas recombinantes. El sistema de cultivo implementado está constituido por dos minibiorreactores instrumentados y manipulados a través de un sistema de control, despliegue y adquisición de datos, acoplados a un sistema de separación de poblaciones celulares en base a su densidad y tamaño mediante elutriación centrífuga a contracorriente. Como modelos biológicos se emplearon dos líneas celulares productoras de anticuerpo monoclonal, un hibridoma murino BCF2 y células CHO-DG44.

Se realizó la caracterización cinética de ambas líneas en crecimiento no sincronizado mediante cultivos tanto estáticos en frascos T como en suspensión en minibiorreactor. El comportamiento cinético de cada línea celular fue similar en ambos sistemas de cultivo obteniendo una concentración celular viable máxima de 2.7×10^6 cel mL⁻¹ en células BCF2 y 1.96×10^6 cel mL⁻¹ en células CHO-DG44; velocidades específicas de crecimiento de 0.031 h⁻¹ y 0.027 h⁻¹ equivalentes a tiempos de duplicación de 22.4 y 30.1 h respectivamente. Mediante contador electrónico de partículas se determinó que las células BCF2 y CHO en crecimiento no sincronizado tuvieron una distribución de tamaño (diámetro) de 11-18 μ m y 10-20 μ m respectivamente. Se realizaron separaciones de células en crecimiento exponencial no sincronizado de ambas líneas para determinar las condiciones óptimas de separación de las poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular así como el rendimiento del sistema de separación. Se determinó mediante

citometría de flujo que el sistema de separación fue capaz de sincronizar en ambas líneas a la población en la fase G1 del ciclo celular con alta pureza, sin embargo, no a las poblaciones en las fases S y G2. El rango de diámetro celular de 13.2-13.5 μm para BCF2 y 11-11.8 μm para CHO fue donde se obtuvieron las poblaciones celulares sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular con mayor pureza; 95% y 89% respectivamente. La concentración celular de BCF2 en crecimiento no sincronizado que permitió obtener el porcentaje mas alto de células en la fase G1 del ciclo celular con alta pureza fue de 3×10^8 células y el rendimiento de células sincronizadas representó el 30% del total de células inyectadas. En el caso de células CHO (de naturaleza adherente) no fue posible definir una concentración celular de inyección óptima ni rendimiento debido a problemas de agregación que se presentaron durante la separaciones. Finalmente, se realizaron cultivos sincronizados de células BCF2 en minibiorreactor de 250 mL de volumen nominal a 50 mL de volumen de trabajo bajo condiciones de cultivo controladas. Se muestrearon los cultivos cada 2-3 hrs durante un periodo aproximado de 3 días. Se determinó un perfil de crecimiento escalonado durante dos ciclos indicativo de la proliferación sincronizada de las células. Con respecto al perfil de consumo-producción de metabolitos glucosa, glutamina y lactato se determinó que a concentraciones celulares entre $0.3-0.6 \times 10^6$ cel mL^{-1} si bien el perfil cinético de consumo-producción fue apreciable, no fue posible determinar diferencias entre las diferentes fases del ciclo celular.

Introducción

Durante las últimas tres décadas ha habido avances sustanciales en la ingeniería del cultivo de células animales a nivel tal que es la tecnología estándar para la producción de un número importante de proteínas recombinantes de uso terapéutico (Ozturk, 2006). En la actualidad, la investigación en el campo se ha centrado en el estudio y resolución de problemas de heterogeneidad de los cultivos con la finalidad de optimizar la cantidad (Lara et al., 2006) y la calidad de las proteínas recombinantes producidas (Du et al., 2014; Hossler, 2012). Los cultivos que se realizan para estudiar y optimizar la producción de proteínas recombinantes son altamente heterogéneos con respecto al ciclo celular del ente biológico. Lo anterior se explica por la naturaleza proliferante de las líneas celulares que se utilizan en cultivo celular. Si bien durante la etapa de crecimiento exponencial de un cultivo heterogéneo las células se encuentran en crecimiento balanceado, la población está altamente segregada en las diferentes fases del ciclo celular, por tanto, los resultados obtenidos son meramente aparentes y no proporcionan información detallada respecto del estado fisiológico y metabólico de las células durante su progresión en las diferentes fases del ciclo celular.

Existe evidencia de que la manipulación de líneas celulares de importancia biofarmacéutica a nivel de ciclo celular se ha empleado como estrategia para optimizar la producción de proteínas recombinantes (Kumar et al., 2007), sin embargo, no se tiene un conocimiento detallado de la contribución de cada uno de los diferentes procesos celulares implicados en la producción de proteínas recombinantes (síntesis, secreción y modificaciones postraduccionales como la glicosilación) durante cada fase del ciclo celular.

En el presente trabajo se desarrolló y caracterizó un sistema de cultivo de células animales sincronizadas en minibiorreactores para realizar cultivos bajo condiciones controladas y homogéneas con respecto al ciclo celular de la población celular. El sistema de cultivo implementado está constituido por dos minibiorreactores instrumentados, manipulados a través de un sistema de control, despliegue y adquisición de datos, acoplados a un sistema de separación de poblaciones celulares -en base a su densidad y tamaño- mediante elutriación centrífuga a contracorriente. En un minibiorreactor se realizan los cultivos de células no sincronizadas para generar altas concentraciones celulares de las

cuales, mediante el sistema de elutriación, se separa a las células sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular con alta pureza. Dichas células se cultivan de forma sincronizada y bajo condiciones de cultivo controladas en un segundo minibioreactor. Dicho sistema permitirá realizar estudios detallados, en las diferentes fases del ciclo celular, de la contribución de los múltiples procesos fisiológicos y metabólicos celulares implicados en la producción de proteínas recombinantes.

1. Antecedentes

1.1 Ciclo celular

En líneas celulares proliferantes el ciclo celular es un proceso iterativo en el que una célula da origen a dos células idénticas; se divide en cuatro fases específicas en virtud de la especificidad de los procesos celulares que se llevan a cabo en cada una: gap 1 (G1), síntesis de ácidos nucleicos (S), gap 2 (G2) y mitosis (M) (Alberts et al., 2008) Durante la fase G1 la célula aumenta su masa y produce grandes cantidades de proteína y RNA. Se ha determinado que en el inicio de la fase G1 (llamada G1 temprana) se presenta una acumulación de proteína tres a cinco veces mayor que en el resto de la fase (Kromenaker y Srienc, 1991). Durante la fase S se lleva a cabo principalmente la replicación de DNA, los daños al mismo son reparados y es la fase en donde se asegura que el material genético se ha duplicado una sola vez. En esta fase la célula está provista del doble de proteínas nucleares y no presenta un incremento neto en la producción de proteína debido a los procesos de secreción y degradación. La fase G2 es una segunda fase de crecimiento en donde continúa la síntesis de proteínas y RNA, la célula sintetiza las proteínas necesarias para la segregación cromosómica y la división celular durante la mitosis, por tanto se convierte en una célula diploide y se observa un cambio en la estructura celular que indica el principio de su división. Durante la fase M la célula experimenta dos procesos importantes, el primero de ellos es la Mitosis, en la que las cromátidas hermanas se separan y segregan en dos núcleos hijos idénticos cada uno de ellos con su propia copia de genoma; en el segundo proceso denominado Citocinesis, la célula finaliza su división dando origen a dos células idénticas (Freshney, 2005).

En un ciclo típico de división celular de aproximadamente 24 horas, las fases G1, S, G2, y M durarían aproximadamente 10, 9, 4 y 1 horas respectivamente, sin embargo, dicho periodo varía y es específico para cada línea celular. Incluso, entre células del mismo linaje puede haber variaciones debido a alteraciones que se presentan durante la progresión del ciclo como es el caso de células que se arrestan en la fase G0 o bien por cambios en la duración de la fase G1 (Lloyd y Al-Rubeai, 1999).

Se han realizado estudios para optimizar el cultivo celular y la producción de proteínas recombinantes basados en la manipulación del ciclo celular, por ejemplo, el uso de agentes químicos y físicos de arresto celular (Sunley y Butler, 2010), la expresión de genes anti-apoptóticos (Figuroa et al., 2007) y la expresión de genes inductores de arresto celular (Fussenegger et al., 1997, 1998; Bi et al., 2004). Sin embargo, muy pocos estudios han evaluado, en las diferentes fases del ciclo celular, la contribución de los múltiples procesos celulares implicados en la calidad y cantidad de las proteínas producidas (Dutton et al., 2006). Al-Rubeai y Emery (1990) usando Timidina como agente químico de arresto celular determinaron que la producción de anticuerpos monoclonales por cultivo de hibridomas sincronizados es máxima durante la fase G1, además, la velocidad específica de producción aumenta cuando el ciclo celular se detiene y se mantiene en G1 tardía. Lloyd et al. (2000) empleando elutriación centrífuga a contracorriente enriquecieron fracciones celulares de cuatro líneas CHO recombinantes de importancia comercial para evaluar la velocidad de productividad específica con base en el tamaño celular y la fase de ciclo, determinando que el mejor parámetro celular para evaluar el incremento de la velocidad de producción específica de una línea celular es el tamaño de las células, ya que dicha producción no se limita a una fase del ciclo celular en particular.

1.2 Sincronización celular

Existe una tendencia natural de los cultivos celulares a progresar de forma no sincronizada, es decir, la población celular prolifera continuamente segregada en las diferentes fases del ciclo celular. Lo anterior se debe a variaciones estocásticas en los tiempos de interdivisión durante el ciclo celular, como la heterogeneidad observada en la duración de la fase G1, que provocan que a través del tiempo un cultivo sincronizado pierda la sincronía (Cooper, 2003).

Un cultivo sincronizado entonces se puede definir como aquel en donde se consigue que una población celular homogénea transite de manera uniforme a través de las diferentes fases del ciclo celular y se divida al mismo tiempo.

Se han descrito diferentes criterios que pueden definir la sincronía de un cultivo celular (Cooper y Shedden, 2003). A continuación se enuncian los más representativos:

- El valor de cada parámetro celular debe ser igual tanto en un cultivo sincronizado como en un cultivo no sincronizado.
- El crecimiento celular no se ve afectado después de la sincronización.
- Mínimo incremento en la concentración celular durante la interfase (G1, S y G2).
- Contenido de DNA y distribución de tamaño estrechos y tiempos de duplicación comparables.

Teóricamente, los procedimientos de sincronización celular permiten obtener poblaciones de células homogéneas en una determinada fase del ciclo celular. De acuerdo a su principio de operación se pueden dividir en dos grupos (Banfalvi, 2011; Holmes y Al-Rubeai, 2000); el primero se basa en detener la progresión del ciclo mediante la exposición de las células a tratamientos químicos o físicos que arrestan a las células en una determinada fase del ciclo celular. Dichos tratamientos, sin embargo, pueden alterar el metabolismo y la fisiología celular y en la mayoría de los casos solamente cumplen un criterio de sincronización (Cooper, 2002, 2003; Urbani, 1995). El segundo grupo se basa en el uso de métodos físicos de separación que aprovechan las propiedades físicas de la población celular (tamaño, densidad, área superficial, etc.) para purificar o separar poblaciones con las mismas características. De entre los múltiples métodos de separación se encuentra la elutriación centrífuga, la cual representa un método ideal para la obtención de altas concentraciones de células sincronizadas en virtud de que se trata de un método preparativo, puede operarse bajo condiciones asépticas y sobretodo porque la alteración al metabolismo y la fisiología celular es mínima (Grosse et al., 2012; Rosas, 2013).

1.3 Elutriación Centrífuga a Contracorriente

1.3.1 Principio de operación

La elutriación centrífuga a contracorriente es un método físico de separación celular desarrollado por Lindhal, (1948) el cual separa a las células con base en su tamaño y densidad. Es un método preparativo, es decir, permite separar altas concentraciones celulares en el orden de 10^9 células. El principio de operación consiste en separar a las células en función de su velocidad de sedimentación en un sistema de fuerza centrífuga en un sentido y flujo de fluido en sentido contrario. La suspensión celular heterogénea se hace fluir en contra de un campo gravitacional dentro de una cámara de elutriación (Véase **Figura 1A**), cada célula se posicionará espacialmente en un punto donde su velocidad de sedimentación esté en equilibrio con la velocidad de flujo de fluido en una posición radial determinada de la cámara, es decir, células de mayor densidad y tamaño se ubican en el fondo de la cámara (entrada de la cámara) y las más pequeñas en la parte cercana a la frontera de elutriación (salida de la cámara) (Véase **Figura 1B**). Al aumentar progresivamente la velocidad de flujo de fluido, las células de menor tamaño serán las primeras en ser expulsadas de la cámara y el resto de la población se irá recorriendo hacia la salida de la cámara hasta alcanzar la frontera de elutriación (Véase **Figura 1C**) (Lindhal, 1956; Grosse et al., 2012).

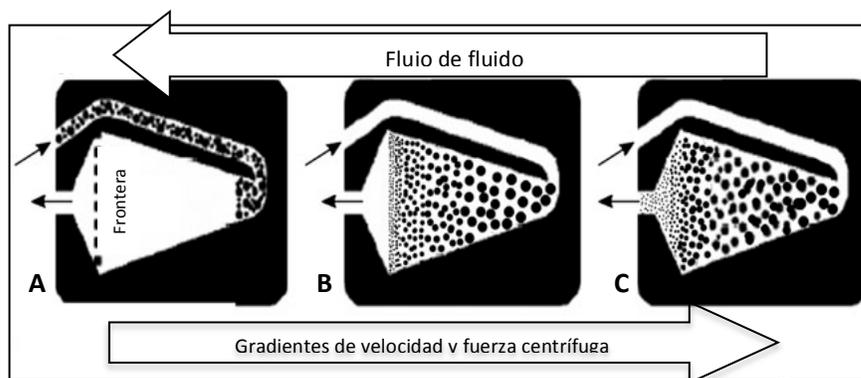


Figura 1. Proceso de elutriación centrífuga. Imagen adaptada de Dorin, (1994); Developing Elutriation Protocols, Technical information, Beckman Coulter Instruments Inc. **A**, Inyección de la población heterogénea. **B**, Separación celular con base en su velocidad de sedimentación. **C**, Expulsión de las poblaciones celulares separadas mediante el incremento de la velocidad de flujo de fluido.

Existe una relación directa entre la fase del ciclo celular de una célula y su tamaño; las células de menor tamaño se encontrarán en la fase G1 del ciclo celular y las del doble de tamaño en la fase G2, las células en la fase S se encuentran distribuidas en todo el rango de tamaños entre las poblaciones en G1 y G2 (Véase **Figura 2**) (Lloyd et al., 2000). En virtud de lo anterior, una población celular heterogénea segregada en las diferentes fases del ciclo celular puede ser separada mediante elutriación centrífuga a contracorriente (Banfalvi, 2008; Kauffman et al., 1990).

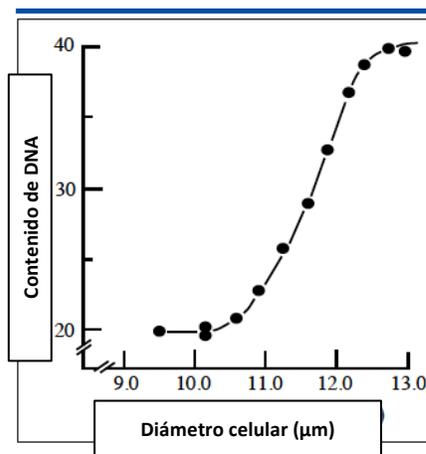


Figura 2. Correlación entre tamaño celular y contenido de DNA determinado en un cultivo de células MEL. Tomado de Furst, (1995). Developing Elutriation Protocols, Technical information, Beckman Coulter Instruments Inc.

La elutriación centrífuga a contracorriente es un procedimiento robusto, diseñado originalmente para la separación de mezclas de células donde existen diferencias importantes en la densidad, tamaño e incluso forma de las células. Sin embargo, en el caso particular de la separación de células de un mismo linaje en las diferentes fases del ciclo celular (con diferencias muy pequeñas de densidad y tamaño entre las células), todas las variables deben ser rigurosamente definidas y controlados para conseguir una buena separación (Barrios, 2014). Ligeras variaciones en el flujo de fluido o la velocidad de centrifugación modifican el equilibrio del sistema de separación. De igual forma, pequeñas variaciones de temperatura, osmolaridad y viscosidad del medio de elutriación modifican tanto el volumen celular como la rigidez de la membrana. En consecuencia, la población de interés saldrá antes o después de lo esperado (Sanderson et al., 1977). Por su parte, un incremento en el nivel de pulsación de la bomba peristáltica y/o la presencia de burbujas en la cámara de elutriación ocasionan una disminución importante de la pureza de las poblaciones

separadas. Además, si la intención es cultivar a las células que fueron separadas, el sistema debe ser operado bajo condiciones asépticas y tanto la temperatura de separación como la composición del medio de elutriación deben ser capaces de mantener la viabilidad de las células y de prevenir la agregación celular durante el proceso de separación (Bachère et al., 1988).

1.3.2 Fundamento matemático de la elutriación centrífuga a contracorriente

El principio matemático que describe al sistema de Elutriación Centrífuga esta basado en la ley de Stokes, la cual expresa la fuerza necesaria de arrastre (F) para mover una partícula esférica pequeña en un flujo laminar a una determinada velocidad (V_s), basándose en el radio de la partícula esférica (r) y la viscosidad del fluido (η) (Sanderson y Bird, 1977).

$$F = 6\pi r\eta V_s \quad (1)$$

De la ley de Stokes se deduce la ecuación de la velocidad de sedimentación; dicha ecuación fue diseñada para partículas esféricas sólidas en un campo de fuerza centrífuga.

$$V_s = \frac{d^2(\rho_p - \rho_m)}{18\eta} \omega^2 r \quad (2)$$

Donde V_s es la velocidad de sedimentación, r es la posición radial, d es el diámetro de la partícula, ρ_p es la densidad de la partícula, ρ_m es la densidad del fluido, η es la viscosidad del fluido y ω es la velocidad angular. Esta ecuación se puede aplicar a las células tomando en cuenta las siguientes consideraciones para el sistema:

- Se asume que la célula tiene forma esférica
- Entre células no hay interacción
- El flujo es laminar

- La densidad y el tamaño celular son constantes durante su transición en la cámara de elutriación.

De la ecuación 2 se observa que la velocidad de sedimentación de las células es directamente proporcional al diámetro de las células al cuadrado, por lo tanto se considera que es el tamaño quien determina mayoritariamente la posición radial de estas dentro de la cámara.

Dado que el equilibrio del proceso de elutriación centrífuga es definido por la velocidad de flujo de fluido y por la fuerza centrífuga, en la ecuación 2 se puede incorporar la ecuación de velocidad de flujo de fluido definida como el flujo (F) entre el área (A) de la sección transversal de la cámara, obteniendo la ecuación 3.

$$V = \frac{F}{A} = \frac{d^2(\rho_p - \rho_m)}{18\eta} \omega^2 r \quad (3)$$

Si se toma en cuenta que la velocidad de flujo de fluido esta descrita por la ley de la conservación de la masa entre dos secciones dentro de un conducto ($V_1A_1=V_2A_2$), dicha velocidad se verá afectada por la forma cónica de la cámara; de tal manera que en el interior de la cámara de elutriación se generan dos tipos de gradientes; uno es el de la velocidad de flujo de fluido, que es máximo a la entrada de la cámara y disminuye hacia la frontera de elutriación, y otro es el gradiente de fuerza centrífuga que también incrementa de la frontera de elutriación hacia la entrada de la cámara. Cuando ambos gradientes (de velocidad y de fuerza centrífuga) son menores, el área de la cámara es mayor y viceversa, por lo tanto las separaciones serán resultado de las diferentes velocidades de sedimentación que están en equilibrio en las diferentes posiciones radiales de la cámara.

Cuando la velocidad de flujo de fluido se incrementa, las células que se encuentran en equilibrio cerca de la frontera de elutriación (de menor tamaño) son expulsadas, mientras que el resto de la población se recorre hacia el centro de rotación hasta alcanzar la frontera, siendo entonces las células de mayor tamaño las últimas en ser

expulsadas. Si de la ecuación 3 se elimina el término de velocidad y se despeja el flujo (F) obtenemos la ecuación 4.

$$F = Ad^2 \frac{(\rho_p - \rho_m)}{18\eta} \omega^2 r \quad (4)$$

Considerando r como el radio del centro de rotación del rotor hasta la frontera de elutriación de la cámara de elutriación (86 mm para la cámara de elutriación estándar); haciendo la conversión de velocidad angular del rotor (ω) a rpm; asumiendo que la diferencia de densidades entre el medio de elutriación y la densidad de las células es de 0.05 g mL^{-1} y que la viscosidad del medio de elutriación oscila en un valor de 1.002 mPa s^{-1} se obtiene un valor de constante adimensional X que para nuestro sistema en específico es de 0.0511. Al considerar el valor de la constante X y de la conversión en la ecuación 4, se obtiene la ecuación 5 con la cual se puede determinar el flujo de fluido necesario para separar una población celular de determinado diámetro a una velocidad de centrifugación dada.

$$F = Xd^2 \left(\frac{RPM}{1000}\right)^2 \quad (5)$$

1.3.3 Elutriación centrífuga como método de sincronización en las diferentes fases del ciclo celular.

Múltiples grupos de investigación han aprovechado las ventajas que ofrece la elutriación centrífuga para obtener células sincronizadas y estudiar aspectos básicos del ciclo celular (Bauer, 1999; Grosse et al., 2012). Kauffman et al. (1990) realizaron modificaciones al sistema tradicional de inyección celular y de fluidos del sistema de elutriación centrífuga a contracorriente, evaluaron la actividad de la enzima Cinasa de Timidina de las diferentes poblaciones de células HeLa, Human 143tk y fibroblastos murinos Ltk⁻ en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular y determinaron que la elutriación centrífuga a contracorriente es el método físico de separación ideal para enriquecer poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular con mínimas perturbaciones fisiológicas. Feder et al. (1989) mediante elutriación centrífuga obtuvieron poblaciones homogéneas de células CHO con el objetivo de

evaluar el patrón de expresión de la enzima dihidrofolato reductasa (DHRF) y sus niveles de RNAm en las diferentes fases del ciclo celular; dicha investigación concluye que la actividad y expresión de la enzima DHRF no cambia a través de las fases del ciclo celular por lo que no puede considerarse una enzima regulada por ciclo. Wahl y Donaldson, (2001) evaluaron la capacidad de dos rotores con cámara de elutriación estándar para obtener poblaciones celulares sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular de la línea WEHI-231. Determinaron que ambos rotores tienen la capacidad de separar células en las diferentes fases del ciclo celular con alta pureza. El trabajo de Lloyd et al., (2000), como se describió en el apartado de ciclo celular, es de los pocos donde mediante elutriación centrífuga se ha determinado que además de la densidad y viabilidad celular, el tamaño celular es un parámetro que debe incorporarse no sólo en los modelos matemáticos de producción de células recombinantes de mamífero, sino también en las estrategias de vigilancia y control de los procesos de producción.

Hasta la fecha no se ha implementado como tal un método de sincronización celular acoplado a un sistema de cultivo en biorreactores para la realización de cultivos sincronizados de células bajo condiciones de cultivo controladas y utilizando líneas celulares de importancia bio-farmacéutica. En un trabajo previo dentro del grupo de investigación se evaluó y demostró que el proceso de elutriación centrífuga permite obtener células animales sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular con alto grado de pureza (Rosas, 2013). Sin embargo, dicho estudio no permitió obtener concentraciones celulares suficientes que permitieran realizar determinaciones analíticas del cultivo sincronizado puesto que el número de células a separar y las densidades celulares obtenidas para llevar a cabo los cultivos sincronizados estaban limitadas por el sistema de cultivo. Es decir, se emplearon frascos T con los cuales no fue posible realizar estudios detallados del cultivo sincronizado (consumo y producción de metabolitos, expresión de proteína, etc.), además de no poder controlar las variables medioambientales del cultivo.

1.4 Cultivo de células animales en Biorreactores

El desarrollo de la ingeniería de cultivo celular en biorreactores a nivel industrial comenzó a mediados de los años cincuenta en respuesta a la necesidad de las técnicas de cultivo en masa que fueran adecuadas para la producción de vacunas. Los primeros biorreactores que fueron diseñados específicamente para el cultivo de células adherentes, sin embargo, los primeros productos de interés comercial se generaron mediante cultivo de células en suspensión. Esto estimuló la adaptación de los sistemas de cultivo en biorreactores que eran utilizados para el cultivo microbiano, para su uso en sistemas de cultivo celular de mayor sensibilidad mecánica. El advenimiento de los anticuerpos monoclonales (AcM) en los años setenta impulsó el desarrollo de una gran variedad de biorreactores y de sistemas de cultivo adecuados para el cultivo celular en suspensión haciendo especial énfasis en el incremento del rendimiento del producto obtenido a través de un mejor suministro de nutrientes y eliminando los productos de desecho. El objetivo de implementar sistemas especializados de cultivo en biorreactor fue minimizar las limitaciones que se presentan en el cultivo celular (por ejemplo un bajo rendimiento en la densidad celular final) proporcionando a las células un ambiente que les permita de manera continua generar el producto de interés a altas concentraciones (Fenge y Lullau, 2006).

Hasta la fecha el cultivo de células animales en biorreactores es parte fundamental de la industria farmacéutica para la producción de proteínas terapéuticas debido a la demanda de la cantidad, el rendimiento y la calidad producto generado (Ozturk , 2014). Eibl y Eibl., (2014) describen la nueva tendencia de realizar cultivos de células animales en biorreactores desechables. La finalidad de implementar dichos dispositivos es minimizar la contaminación, el tiempo de limpieza y esterilización, además de promover la eficiencia de los procesos y en consecuencia la reducción de tiempo de comercialización de nuevos productos (ej. proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales para terapia y diagnóstico). Sin embargo, la ingeniería de cultivo celular en biorreactores no ha visualizado la importancia de llevar a cabo cultivos homogéneos bajo condiciones de cultivo controladas para conocer la contribución de los múltiples procesos de regulación, expresión genética, secreción,

etc. implicados en la producción de proteínas recombinantes, en las diferentes fases del ciclo celular. Lo anterior es de suma importancia para conseguir optimizar los procesos de producción de proteínas recombinantes.

2. Hipótesis

El estudio de los procesos celulares en las diferentes fases del ciclo celular, mediante cultivos bajo condiciones controladas y con células sincronizadas proporcionará información detallada para optimizar los procesos de producción de proteínas recombinantes.

3. Justificación

El desarrollo de un sistema de cultivo de células animales sincronizadas en biorreactores permitirá realizar cultivos bajo condiciones celulares y de cultivo homogéneas y controladas para el estudio detallado de los procesos celulares implicados en la producción y calidad de las proteínas recombinantes, lo cual es imposible realizar mediante cultivos celulares heterogéneos tradicionales. Lo anterior representa una estrategia novedosa para la optimización de los bioprocesos de producción de proteínas recombinantes.

4. Objetivos

Objetivo general: Desarrollar un sistema de cultivo de células animales sincronizadas en un minibiorreactor instrumentado operado bajo condiciones de cultivo controladas.

Objetivos particulares

- Caracterización cinética del crecimiento en biorreactor de las líneas celulares de Hibridoma Murino BCF2 y células CHO-DG44.
- Montaje del sistema de cultivo de células animales sincronizadas.
- Determinar las condiciones óptimas de sincronización por elutriación centrífuga a contracorriente de Hibridoma BCF2 y células CHO-DG44
- Realizar cultivos sincronizados de líneas celulares productoras de AcM en un minibiorreactor operado bajo condiciones de cultivo controladas (cinéticas de ciclo celular).

5. Materiales y Métodos

5.1 Modelos Biológicos

CHO-DG44 e Hibridoma Murino BCF2

La línea celular CHO DG44 (ATCC-PTA3356) produce un anticuerpo monoclonal humano contra el receptor VLA-1 (Integrina $\alpha 1\beta 1$) que está implicado en procesos inmunológicos e inflamatorios.

El Hibridoma Murino BCF2 utilizado en el presente proyecto se derivó de una línea de ratones Balb/c. El AcM que produce es de clase G (IgG2a), neutralizante y específico contra la toxina del veneno del alacrán *Centruroides noxius Hoffman*. La toxina Cn-11-9 es el péptido más tóxico del conjunto de toxinas presentes en el veneno. Este AcM actúa inhibiendo la unión de la toxina con las membranas sinaptosomales del cerebro del ratón, mostrando así una actividad neutralizante *in vivo* (Zamudio et al. , 1992). La línea celular fue proporcionada por el Dr. Lourival Possani del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.2 Medios de cultivo

Medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) Gibco®

El medio DMEM Gibco® sin SFB (Cat. No. 12430-120) se empleó como medio de elutriación para realizar la separación de las poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular.

Medio Químicamente Definido para Hibridomas 1X (CDM) Gibco®

Medio CDM Gibco® (Cat. No. 11279-023) se empleó como medio de cultivo suplementado con 8 mM de L-Glutamina (Sigma No. Cat. 3126) para la línea celular BCF2, es recomendado por Gibco® para hibridomas productores de AcM.

Cellvento CHO-100 Merck®

Medio Cellvento CHO-100 Merck® (Cat. No. 1.00899.0010) se empleó para cultivar a la línea celular CHO-DG44. Este medio es químicamente definido, se desarrolló para el crecimiento de células CHO y la expresión de anticuerpos monoclonales o de proteínas recombinantes de cultivos en suspensión. Cabe mencionar que dicho medio fue diseñado para el crecimiento de células CHO-S, sin embargo, es un medio adecuado para cualquier tipo de células CHO. El medio se suplementó con 8 mM de L-Glutamina y 2.0 g L⁻¹ de bicarbonato de sodio (Sigma No. Cat. S-6014) .

5.3 Mantenimiento celular

Congelación de células BCF2 y de células CHO-DG44

Se realizar los cálculos necesarios considerando que al final del proceso cada criovial debe contar con una concentración entre 5 y 10 millones de células viables por mililitro.

Se centrifugó el volumen de cultivo celular adecuado en tubos cónicos, por 10 minutos a 800 RPM para formar el botón celular. Se preparó una mezcla de medio fresco (suplementado con L-Glutamina a 8 mM) con DMSO (Dimetil Sulfóxido) conteniendo 45% de medio de cultivo y 10% de DMSO del volumen final a emplear. Esto se llevo a cabo en hielo debido a lo exotérmico de la reacción.

Posterior a la centrifugación se trasvasó el medio sobrenadante (medio acondicionado) en un tubo cónico estéril para su posterior empleo. El paquete celular se resuspendió en el medio acondicionado correspondiente al 45% del volumen final. Se mezclaron los volúmenes de la mezcla de medio y DMSO y del medio acondicionado con células. Se dispensó 1 mL por criovial, se colocó en congelación a -30°C y una vez congelados, se preservaron los crioviales en N₂ líquido.

Descongelado

Se vertieron 4 mL de medio fresco para cada línea celular en un tubo cónico estéril del 15 mL. En un frasco T de 25 cm² se colocaron 5 mL de medio cultivo fresco.

Se descongeló un criovial de cada una de las líneas celulares, pasando a 37°C en el menor tiempo posible. El mililitro de células del criovial se trasvasó en el tubo cónico con 4 mL de medio de cultivo fresco y se centrifugó a 800 RPM por 10 minutos. Con la finalidad de resuspender y lavar las células del DMSO.

Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con el volumen del medio de cultivo contenido en el frasco T 25, mismo se incubó a 37° C, 5% de CO₂ y humedad a saturación.

5.4 Cultivos celulares

5.4.1 Cultivo en Frascos T

Las células empleadas para la realización del proyecto se cultivaron en frascos T de 25, 75, 175 y 225 cm² de área superficial (NUNC y CORNING) en los cuales se colocaron volúmenes de 5, 15, 35, y 45 mL respectivamente, se tomó muestra cada 24 horas para determinar la concentración celular y viabilidad del cultivo. Los cultivos en frascos T se llevaron a cabo para el mantenimiento de las células en cultivo, para la generación de bancos celulares y de inóculos para los biorreactores.

5.4.2 Cultivos en Minibiorreactor

En el presente proyecto se trabajó con dos minibiorreactores instrumentados Applikon de 500 y 250 mL de volumen nominal operados a un 70 % de su capacidad para asegurar la transferencia de gases hacia el seno del líquido, autoclavables y acoplados a un sistema de control, adquisición y despliegue de datos (my-Control y BioExpert).

5.4.2.1 Adecuación y adaptación de puertos de adición y adquisición de muestra, electrodos, mangueras y filtros.

Se seleccionaron los puertos de entrada/salida del medio de cultivo, toma de muestra, inyección de gases, salida de gases e inyección de NaOH 0.4 M (para control de pH en las células CHO-DG44). Para asegurar la esterilidad del sistema se colocaron filtros Milipore de 0.22 μm en la entrada y salida de gases. Se utilizaron tubos cónicos de 15 mL (Sarstedt) en el puerto de toma de muestra. Se conectó el puerto de entrada y salida de medio de cultivo a un frasco de 500 mL para la manipulación del contenido del vaso del minibiorreactor, con la finalidad de sacar agua después de la esterilización, la entrada de medio fresco e inóculo y salida de medio agotado con células, operado por cambios hidrodinámicos.

5.4.2.2 Software my-Control y BioXpert V.2 (Applikon Biotechnology)

my-Control es un biocontrolador de los parámetros que se manejan en el minibiorreactor: pH, oxígeno disuelto, agitación y temperatura durante un cultivo. Las rutinas de control se operaron mediante controles Proporcional Integral Derivativo (PID) predeterminados de fabrica para cultivo de células de mamífero.

El software BioXpert V.2 se instaló para la adquisición y despliegue del proceso de fermentación y cultivo celular. Cuenta con un módulo especial de instalación definido por el usuario para el acoplamiento de diferentes reactores a la PC. BioXpert V2 cuenta con un editor y una biblioteca de ecuaciones para el análisis de los datos de cultivo en lote, cultivo alimentado y de cultivo continuo. La interpolación de los datos de *spline* cúbico se puede utilizar para hacer los cálculos. Prácticamente todas las funciones son accesibles desde la ventana principal (pantalla) del programa a través de la interfaz gráfica. BioXpert V2 tiene utilidades especiales para el intercambio de archivos de datos con otros programas de fermentación y hojas de cálculo.

5.4.2.3 Calibración electrodo pH

Se calibró el electrodo de pH, conectado a la unidad de control y al software my-Control, utilizando Buffer de pH 7 y pH 4 a temperatura conocida, de acuerdo al manual del equipo y software. NOTA: El electrodo de pH se calibra antes de esterilizar el minibiorreactor sin haber alteraciones de la misma después de la esterilización.

5.4.2.4 Lavado y esterilización de Minibiorreactor

Se lavó el minibiorreactor con una solución de detergente Extran al 5% y etanol al 70%, asegurándose de enjuagar bien con agua destilada. Se colocaron 200 mL de agua MilliQ a la jarra, una vez limpio, con la finalidad de que los electrodos queden inmersos durante la esterilización. Se colocaron los electrodos de pH y DO y se montó el minibiorreactor a su base.

Se esterilizó por autoclave a 121 °C durante 20 minutos, sin pre-vacio y a escape lento, dejando abierto el filtro de la salida de gases del reactor y del frasco de 500 mL para evitar la presurización del reactor y la ruptura de la jarra de cultivo o el electrodo de pH.

5.4.2.5 Calibración del electrodo de oxígeno disuelto (OD)

Después de la calibración del minibiorreactor y previo a la calibración del electrodo de OD, se dejó enfriar el reactor hasta alcanzar la temperatura de trabajo (37 °C) y polarizar el electrodo conectado al *my*-Control durante 4 horas mínimo. La calibración se realizó a dos puntos: 1) A saturación con aire a 37 °C, mediante burbujeo de aire, lo cual es equivalente a una presión parcial de O₂ de 0.21 %, interpretado en el sistema como 100% de OD. 2) A saturación de Nitrógeno mediante burbujeo de N₂ a 37 °C, interpretado en el sistema como 0 % de OD.

5.4.2.6 Preparación del inóculo

De los cultivos en frascos T, se tomó el volumen necesario de medio de cultivo con 0.2×10^6 cel mL⁻¹ en un volumen final de 300 mL; se inoculó el reactor mediante una

inyección hidrodinámica a través del sistema y se controlaron las condiciones de cultivo empleando el software my-Control.

5.4.2.7 Muestreo

Empleando vacío y bajo condiciones de esterilidad, se colectaron muestras de 0.5 mL del cultivo a través del puerto de toma de muestra para poder realizar el conteo y conocer la concentración y viabilidad celular del cultivo.

5.4.2.8. Control de los parámetros de cultivo

El pH del cultivo se controló con inyección de NaOH 0.4 M y con inyección de CO₂. El porcentaje de oxígeno disuelto se controló con inyección de O₂ y N₂. La temperatura mediante una manta de calentamiento y la agitación con un impulsor de paletas inclinadas específico para cultivo de células animales. La aeración del sistema se realizó por burbujeo a un flujo de gases máximo de 5 mL min⁻¹ para no generar una gran cantidad de espuma en el cultivo que pudiera impactar de manera significativa la viabilidad celular.

5.4.3 Concentración y viabilidad celular

Para determinar la concentración celular se tomó una muestra de cultivo y se empleó la técnica de exclusión del colorante azul Tripano al 0.2% en PBS y se contaron utilizando la cámara de Neubauer. Se realizaron las diluciones necesarias entre la muestra tomada y el colorante para contabilizar entre 200 y 400 células en los 10 campos de la cámara. El colorante es un indicador de la integridad de la membrana citoplasmática. Mediante esta tinción, las células muertas son permeables al colorante y se tiñen de azul, mientras que las células vivas permanecen refringentes.

5.5 Determinación de tamaño celular relativo

Para determinar el tamaño celular relativo en ambas líneas celulares, se empleó un contador electrónico Coulter Multisizer 3, el cual está compuesto de múltiples microcanales que conectan dos cámaras conteniendo una solución electrolítica sobre las cuales se aplica una diferencia de potencial. La solución es forzada a fluir de una cámara a otra arrastrando consigo las partículas/células en suspensión, que al atravesar el microcanal producen un breve cambio en la resistencia del líquido. El contador detecta estos cambios en la resistencia eléctrica. Las células, al tratarse de partículas muy poco conductoras, alteran la sección conductiva del microcanal, causando que la resistencia entre los extremos del microcanal aumente y que la corriente eléctrica que atraviesa el canal disminuya por un breve período de tiempo.

La amplitud del cambio en la corriente que atraviesa el microcanal se encuentra directamente relacionado al volumen de la partícula/célula, permitiendo medir la distribución del tamaño relativa de las partículas/células contadas.

5.6 Cinéticas de crecimiento celular

Las cinéticas de crecimiento celular se realizaron para determinar la velocidad de crecimiento máxima a partir de la etapa de crecimiento exponencial de las curvas de crecimiento de las líneas celulares Hibridoma murino BCF2 y CHO-DG44 durante 132 y 116 horas respectivamente, tiempo en el que las células disminuyen su viabilidad a un 70 %.

Para el presente proyecto se plantea un cultivo en lote, en el cual las células crecerán en un minibioreactor a una concentración inicial de 0.2×10^6 cel mL⁻¹ con una viabilidad del 90 % sin alterar los nutrientes, así el volumen de medio de cultivo permanecerá constante y las condiciones medioambientales (pH, oxígeno disuelto OD, temperatura y velocidad de agitación) del cultivo serán controladas mediante un sistema de despliegue y adquisición de datos (Software).

5.7 Sistema de Elutriación Centrífuga a contracorriente

En la **Figura 3** se muestra el sistema de elutriación centrífuga a contracorriente, que es un sistema de separación compuesto por un sistema de circulación de fluido acoplado a un rotor JE-6B (Beckman) que contiene una cámara de separación de células. La fuerza de rotación del rotor esta dada por una ultracentrífuga J2-21 (Beckman).

El sistema de circulación de fluidos están constituido por una jeringa y un *bypass* específicos para la inyección de muestra, una bomba peristáltica de velocidad variable, manómetro, una cámara para disminuir perturbaciones durante la inyección, manguera que conecta todo el sistema y un reservorio para medio líquido de elutriación.

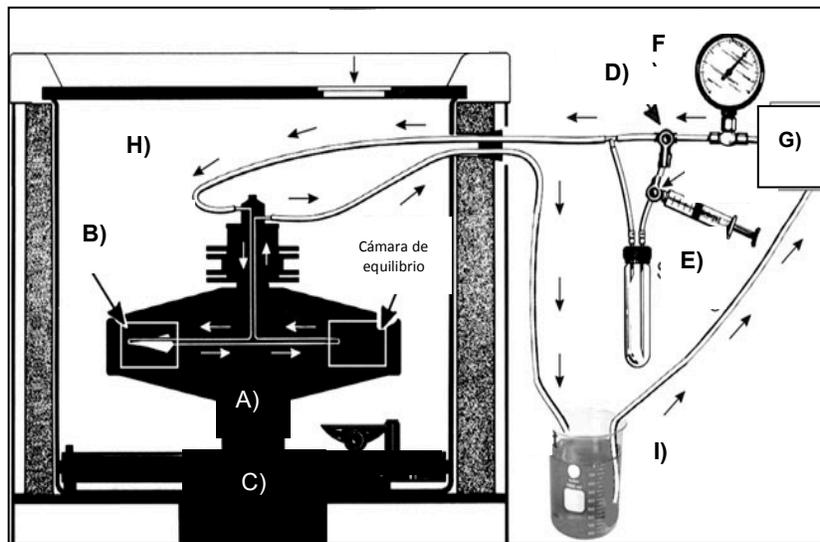


Figura 3. Sistema de elutriación centrífuga a contracorriente. **A)** Rotor. JE-6B **B)** Cámara de separación celular (cámara de elutriación). **C)** Ultracentrífuga. **D)** *bypass*. **E)** Cámara de mezclado. **F)** Manómetro **G)** Bomba peristáltica. **H)** Conexiones (manguera). **I)** Reservorio para medio de elutriación.

5.7.1 Ultracentrífuga, Rotor y Cámara de elutriación

En el presente proyecto se empleó una ultracentrífuga análoga J2-21 (Beckman).

A la ultracentrífuga se acopló un rotor JE-6B (Beckman), diseñado para usarse a una velocidad máxima de 6000 rpm y para separar células de 5-50 μm de diámetro. Dentro del rotor se encuentra la cámara de elutriación (Véase **Figura 4**). Para el presente proyecto se utilizó la cámara estándar. Dicha cámara presenta una forma cónica, de 4.2 mL de volumen y con una capacidad máxima de separación de 10^7 - 10^9 millones de células.

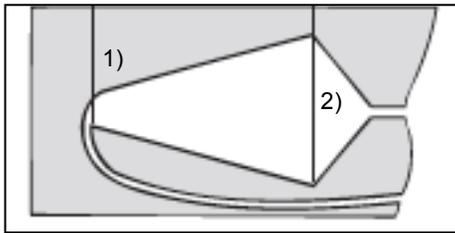


Figura 4. Cámara de elutriación estándar. **1)** Entrada de la cámara. **2)** Frontera de elutriación. Tomada del Instruction manual The JE-6B Elutriation System and Rotor, Beckman Coulter.

5.7.2 Bomba peristáltica MiniPuls 3 (Gilson)

Al sistema se acopló una bomba peristáltica MiniPuls 3 (Gilson) diseñada para circular líquidos de manera estable con un bajo nivel de pulsación. La bomba opera con un motor híbrido controlado con un microprocesador integral utilizando un display y teclado.

5.7.2.1 Curvas de calibración de la bomba peristáltica

Se realizaron tres curvas de calibración a 1000, 1500 y 2000 RPM de velocidad del rotor de elutriación. Se emplearon manguera de silicón (Masterflex) de 3.1 mm de diámetro interno y manguera Tygon de 4 mm de diámetro interno, ambas de pared delgada.

Se tomaron volúmenes de medio de elutriación (DMEM) por triplicado en tubo cónico de 50 mL durante un minuto de las siguientes velocidades de la bomba 8, 16, 24, 32, 40 y 48 rpm para la curva a 1000 rpm y 5, 10, 20, 30, 40 y 48 rpm para las curvas a 1500 y 2000 rpm. Con los valores de flujo promedio obtenidos se construyó la curva de calibración de la bomba.

5.7.3 Procedimiento general de Elutriación Centrífuga

Una vez que el sistema esta conectado (Bomba-Minibiorreactor-Rotor) se ajustan los parámetros de elutriación, es decir, velocidad de rotor (RPM) y velocidad de flujo de la bomba (mL min^{-1}). Se enciende la bomba al flujo de trabajo y con la bomba en funcionamiento se enciende el rotor.

El sistema se lava con etanol al 70 % por un tiempo aproximado de 15 minutos para sanitizar el sistema y posteriormente se vacía de etanol. El sistema se lava con PBS 1X durante 15 minutos para eliminar los restos de etanol. Finalmente se introduce al sistema el medio de elutriación y a continuación se inyecta la muestra a una velocidad que permita que las células ingresen a la cámara de elutriación sin que estas alcancen la frontera.

Una vez que las células se encuentran en la cámara de elutriación se incrementa la velocidad de flujo de la bomba (mL min^{-1}) hasta alcanzar el flujo al cual las células más pequeñas alcancen la frontera de elutriación. Las fracciones de interés se colectan incrementando el flujo de fluido a razón de $1\text{-}2 \text{ mL min}^{-1}$. Para eliminar aglomerados celulares se continua el incremento de la velocidad de flujo al máximo.

Con la máxima velocidad de flujo de la bomba, la velocidad del rotor se disminuye con el fin de asegurar que la cámara queda libre de restos celulares. Lavar el sistema con etanol al 70% durante 15 minutos para limpiar el sistema. Se deja el sistema de elutriación en etanol al 70 %, se apaga la bomba y el rotor.

NOTA: La presión interna del sistema en funcionamiento no debe pasar de 10 libras. Durante el proceso de sanitización se eliminaron las burbujas de aire dentro del sistema modificando la velocidad del rotor de la centrífuga. Una vez que el medio de elutriación se encontraba en el sistema, se tomaron tres muestras a diferentes flujos de la bomba peristáltica para asegurar la calibración de la misma, debiendo ajustar si es necesario.

5.7.3.1 Obtención de la población celular en la fase G1 del ciclo celular

La fracción de interés con alta pureza de células en la fase G1 se colectó en condiciones de esterilidad dentro de la campana de flujo laminar en tubos cónicos de 50 mL nuevos y estériles. Se centrifugó a 800 RPM durante 10 minutos y el paquete celular se resuspendió en 50 mL de medio de cultivo fresco suplementado con 8 mM de L-Glutamina para iniciar un cultivo en minibiorreactor de 250 mL de volumen nominal de las células sincronizadas.

5.7.3.2 Inyección de células no sincronizadas al sistema de elutriación para la caracterización de sistema.

De un cultivo de células no sincronizadas en minibiorreactor de 500 mL de volumen nominal se tomó el volumen de medio de cultivo con células necesario para tener $3-5 \times 10^8$ células. Se centrifugó a 800 RPM durante 10 minutos y el paquete celular obtenido se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo fresco. En una jeringa estéril de 5 mL se tomó el concentrado y se inyectó a través de la llave de inyección del sistema de elutriación, cerrando el *bypass* y abriendo la llave de inyección de muestra para que el medio de elutriación no pasara por la cámara de mezclado y así únicamente permitiera el paso de la muestra, cuidando en todo momento que el flujo de inyección de la muestra no sobrepasara el flujo mínimo para la obtención de la primera fracción de células elutriadas.

5.7.3.3 Inyección directa de células no sincronizadas al sistema de elutriación mediante una inyección hidrodinámica para obtener una población en la fase G1 del ciclo celular.

Del cultivo de células no sincronizadas en minibiorreactor de 500 mL de volumen nominal se realizó una inyección directa al sistema de elutriación del volumen total del cultivo por medio de inyección hidrodinámica, es decir, introduciendo aire estéril desde la entrada de gases del minibiorreactor a una velocidad de flujo de fluido mínima (aproximadamente de 2 mL min^{-1}) y manteniendo abierto el *bypass*. Una vez que se inyectó todo el volumen de medio con células, el *bypass* se cerró para

permitir que el medio de elutriación circulara por el sistema a la velocidad de flujo de fluido mínima a la que las células lograron entrar a la cámara de elutriación.

Todas las líneas de transporte de fluido del sistema de elutriación emplearon mangueras de PVC impermeable a gases NALGENE (Thermo Scientific 180) de pared delgada y de 3.9 mm de diámetro interno (ID).

5.7.3.4 Evaluación de la Sincronía

Una vez inoculadas las células sincronizadas en el minibiorreactor, se muestreo cada 2-3 horas para realizar el cálculo de concentración y viabilidad celular.

5.7.3.5 Barrido de ciclo celular

De acuerdo al procedimiento general de elutriación se tomaron fracciones a diferentes velocidades de flujo. Conociendo el diámetro de las células CHO-DG44 e Hibridoma murino BCF2, se realizó el cálculo para determinar los flujos de fluido a la velocidad del rotor establecida para separar a la población celular heterogénea en las diferentes fases del ciclo celular. Como buffer de elutriación se empleó medio DMEM sin Suero Fetal Bovino (SFB) y 4 mM de L-Glutamina.

Del cultivo en minibiorreactor de 500 mL de volumen nominal se tomó el volumen necesario para obtener $3-5 \times 10^8$ células. Las fracciones de células de Hibridoma murino BCF2 y células CHO-DG44 se colectaron en intervalos de uno y dos mililitros respectivamente, en condiciones no estériles y en hielo. Se tomó una muestra de 500 μ L para realizar conteo celular por citometría de flujo, así como el volumen necesario para obtener 1×10^6 células para posterior análisis de contenido de DNA.

5.8 Determinación de contenido de DNA por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas por delante de un haz de láser focalizado. La citometría de flujo es una tecnología (proceso) que permite la medida simultánea de múltiples características físicas de

una sola célula tales como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia.

5.8.1 Estandarización del sistema

A partir de un cultivo en frasco T de 75 cm² con 15 mL se tomaron ocho muestras con 1x10⁶ células cada una, las muestras fueron procesadas de la siguiente manera para determinar las condiciones óptimas para el análisis de contenido de DNA.

Cuatro muestras se fijaron con etanol absoluto toda la noche a -20 °C. Dos de esas muestras se incubaron con el colorante fluorescente yoduro de propidio a 37 °C por un tiempo de 20 minutos y 30 minutos respectivamente en oscuridad; las otras dos fueron incubadas a temperatura ambiente a los mismos tiempos.

Cuatro muestras se fijaron con etanol al 70% durante una hora a -20 °C, siguiendo el procedimiento anterior respecto a la temperatura y el tiempo de incubación con el colorante fluorescente yoduro de propidio.

Se determinó que las condiciones óptimas de fijación celular y de tinción para la cuantificación del contenido de DNA por citometría de flujo son Etanol 70% y 20 minutos de incubación a 37 °C.

5.8.2 Fijación celular

En un tubo de citómetro (Facs) se colocaron 2 mL de etanol al 70% y se mantuvo a -20 °C en congelador. Un millón de células se centrifugaron a 1500 RPM durante 10 minutos, el paquete celular obtenido se resuspendió en aproximadamente 200 µL de medio de cultivo acondicionado.

La suspensión celular se vertió en el tubo de citómetro con etanol al 70% frío con la finalidad de no dañar el DNA de las células debido a que se trata de una reacción exotérmica, gota a gota y vortexeando el tubo con etanol para evitar aglomeración. Las células ya en el etanol se fijaron durante una hora a -20 °C.

5.8.3 Tinción de DNA

El tubo con las células fijadas se centrifugó a 1500 RPM durante 10 minutos y se decantó para eliminar etanol. Las células se lavaron con un mililitro de PBS 1X frío, mismo que se centrifugó a 1500 RPM durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y a las células se les adicionó 10 μL de la enzima RNAsa a una concentración de 10 mg mL^{-1} , 40 μL del colorante fluorescente yoduro de propidio a una concentración de 1 mg mL^{-1} y 950 μL de PBS 1X.

Las células teñidas se incubaron a 37°C durante 20 minutos en oscuridad.

5.8.4 Lectura en citómetro FACS Calibur

Las lecturas de contenido de DNA se llevaron a cabo en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson) el cual cuenta con un software de análisis Cell Quest.

Cada muestra se adquirió a una velocidad de 12 μL por minuto y los gráficos se generaron a partir de un análisis de 10 000 eventos usando los detectores FSC (dispersión de luz frontal proporcional al tamaño celular), SSC (dispersión de luz lateral proporcional a la complejidad celular), FL2-Area y FL2-Ancho (intensidad de fluorescencia proporcional al contenido de DNA celular), con umbral de lectura en el detector FSC-H (Ormerod, 2002).

5.9 Cuantificación de la concentración de Glucosa, Lactato y L-Glutamina

Glucosa, Lactato y L-Glutamina fueron los metabolitos que se determinaron enzimáticamente en un multianalizador YSI modelo 2700 (Yellow spring instruments, CO). El multianalizador YSI utiliza membranas con enzimas inmovilizadas de glucosa oxidasa para determinar glucosa, L-lactato oxidasa para lactato, glutaminasa/L-glutamato oxidasa para glutamina y glutamato. Las enzimas catalizan la reacción oxidativa entre la muestra a determinar y el oxígeno, formando un derivado y peróxido de hidrogeno, este último es oxidado en el ánodo de platino de una sonda, lo que genera una corriente eléctrica que es linealmente proporcional a la concentración de peróxido de hidrogeno y este a su vez de la concentración del metabolito medido. Finalmente, utilizando un estándar de concentración conocida

que producirá una corriente eléctrica determinada, es posible conocer la concentración de la muestra.

5.10 Consideraciones matemáticas

5.10.1 Velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento (μ) es una propiedad de los cultivos celulares, dicho valor es producido bajo condiciones de crecimiento específicas. La μ se calculó por medio de una regresión lineal obtenida de la gráfica de $\ln (X/X_0)$ contra tiempo. Donde X y X_0 son las concentraciones inicial del cultivo y final de las células viables al tiempo t , respectivamente.

$$dx/dt = \mu X \quad (1)$$

Integrando:

$$\ln (X/X_0) = \mu t \quad (2)$$

El cálculo de la velocidad específica de crecimiento se realizó como parte de la caracterización del sistema biológico en un sistema de cultivo en minibiorreactor, además de que dicho valor se empleó para los cálculos de predicción de concentración de cosecha.

5.10.2 Velocidad de rotor JE-6B y flujos para colecta de fracciones

A partir de un nomograma (Véase **Figura 5**) se realizó una estimación de las velocidades de centrifugación a emplear (1000, 1500 y 2000 RPM) y del rango de flujos necesarios para separar a las poblaciones celulares de interés que bomba peristáltica a emplear otorgaría. Una vez hecha la estimación se realizó el cálculo

teórico de los flujos para separar a una población celular no sincronizada en las diferentes fases del ciclo celular empleando la ecuación simplificada de la ley de Stokes y la determinación de diámetro celular.

$$F = Xd^2(\text{RPM}/1000)^2 \quad (1)$$

Donde: F = Flujo de la bomba en mL min⁻¹
X = Constante de la cámara de elutriación (0.0511)
d = Diámetro celular (μm)
RPM = Velocidad del rotor.

5.11 Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de las curvas de calibración de la bomba peristáltica, cinéticas de crecimiento celular y contenido de DNA se usaron los siguientes parámetros de estadística descriptiva.

- Desviación estándar (SD) como medida de centralización o dispersión de los datos.
- Coeficiente de correlación (R), que mide el grado de relación entre las variables cuando su relación es lineal. La correlación es mayor cuando más se aproxima a uno.

Para la obtención de los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo celular se usaron los modelos matemáticos Dean-Jett-Fox y Watson Pragmático del software de análisis FlowJo. Este software ajusta los datos obtenidos del análisis de ciclo celular usando el modelo pragmático de Watson o el modelo Dean-Jett-Fox. Estos modelos son usados para definir a las poblaciones de G1, S y G2 del ciclo celular de una población heterogénea; ambos modelos ajustan a dichas poblaciones a una curva Gaussiana. El modelo de Watson no hace suposiciones acerca de la distribución de la fase S sino que del total de la población resta los datos

pertenecientes a las poblaciones en G1 y G2 y posteriormente se construye una función que se adapte a los datos restantes. El modelo Dean-Jett-Fox ajusta a la fase S a un polinomio de segundo grado. Sin embargo, los porcentajes relativos de células en cada una de las fases del ciclo se obtuvieron aplicando los modelos matemáticos Watson Pragmático y Dean-Jett-Fox con una restricción (los modelos asumen que el contenido de DNA del pico correspondiente a las fase G2 es el doble del contenido de DNA del pico correspondiente a la fase G1 y que los coeficientes de variación entre ellos es igual). Dicha restricción se realiza con la finalidad de ajustar el modelo para analizar a la población de interés y así obtener un valor estimado del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

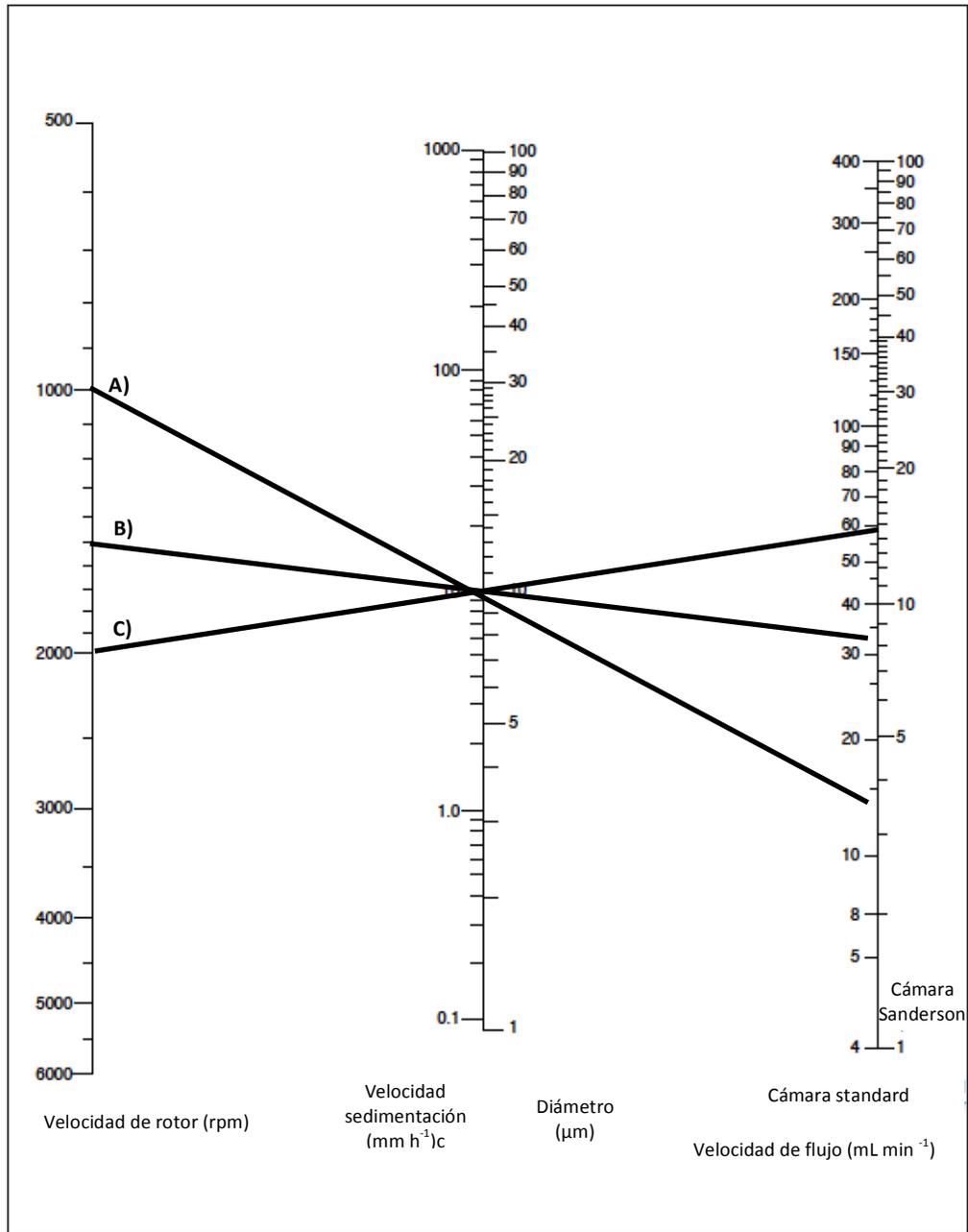


Figura 5. Nomograma empleado para estimar las velocidades del rotor JE-6B. Se muestra extrapolación de los valores de velocidad de rotor, diámetro celular y velocidad de flujo empleando la cámara estándar. **A)** Velocidad de rotor de 1000 rpm. **B)** Velocidad de rotor de 1500 rpm. **C)** Velocidad de rotor de 2000 rpm. Nomograma tomado de Instruction manual The JE-6B Elutriation System and Rotor, Beckman Coulter.

5.12 Reactivos

5.12.1 PBS 10X

Se pesaron las siguientes sales:

- 82 g de NaCl (J.T. Baker No. Cat. 3624-05)
- 2.0 g de KCl (J.T. Baker No. Cat. 3040)
- 14.4 g de Na₂HPO₄ (Sigma Aldrich No. Cat. S0876)
- 2.4 g de KH₂PO₄ (Sigma Aldrich No. Cat. P-5379)

Las sales fueron disueltas en un litro de agua MilliQ estéril, se ajusto pH de la solución a 7.2 y se filtró a través de membrana de 0.22 µm.

5.12.2 Azul tripano

- Se pesó 2.0 g del colorante azul tripano (Sigma Aldrich No. Cat. T-0776)
- De la solución de PBS 10X se realizo una dilución 1:10 (PBS 1X) para preparar 100 mL del colorante a una concentración de 0.2%.
- El colorante se filtró a través de una membrana de 0.22 µm.

5.12.3 L-Glutamina 200 mM

- Se pesó 2.99 g de L-Glutamina (Sigma Aldrich No. Cat. G-5763)
- Se disolvió en 50 mL de agua MilliQ estéril y se llevó a un volumen final de 100 mL.
- Se filtró en membrana de 0.22 µm y se congelo a -30 °C.

5.12.4 Yoduro de propidio 1mg mL⁻¹

- Se pesó 0.001 g de colorante fluorescente yoduro de propidio (Sigma Aldrich No. Cat. P-4170).
- Se resuspendió en un mililitro de PBS 1X
- Se conservó a -4°C en osuridad.

5.12.5 RNAsa 10 mg mL⁻¹

- Se pesó 10 mg de la enzima (Sigma Aldrich No. Cat R6513)
- Se resuspendió en 1 mililitro de PBS 1X.
- Se conservó a -20°C.

6. Resultados y Discusiones

6.1 Caracterización de las líneas celulares

6.1.1 Cinética de crecimiento celular en minibiorreactor de un cultivo no sincronizado de células de Hibridoma murino BCF2 y células CHO-DG44.

Se realizó una cinética de crecimiento celular en un minibiorreactor instrumentado (Applikon) de 500 mL de volumen nominal a 300 mL de volumen de trabajo de ambas líneas celulares no sincronizadas para conocer su comportamiento cinético en un sistema de cultivo en suspensión bajo condiciones de cultivo controladas. Las variables medioambientales fueron controladas a través del software BioXpert V.2 (Applikon) a una temperatura de 37.0 °C, agitación= 180 rpm, pH= 7.1 y OD= 50 %. Ver **Figura 6**.

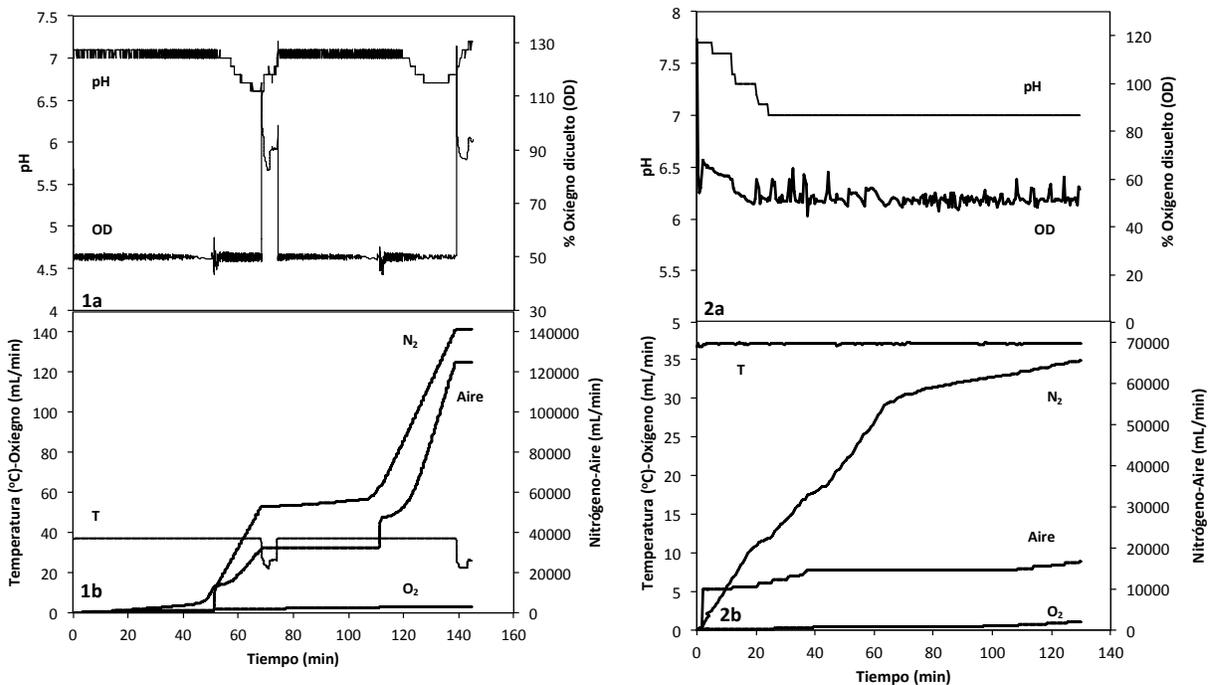


Figura 6. Control de las variables de cultivo en minibiorreactor a través del software BioXpert V.2. Control de pH, OD, flujo acumulativo de gases (Nitrógeno, Aire y Oxígeno) y temperatura de un cultivo heterogéneo en minibiorreactor instrumentado de 500 mL de volumen nominal. **1a-b**, de células BCF2 cultivadas en medio CD-Hybridoma. **2a-b**, de células CHO-DG44 cultivadas en medio CellVento 100.

En la **Figura 7A** se presenta el perfil cinético de crecimiento de hibridomas BCF2 el cual mostró que durante 110 horas las células crecen de manera exponencial manteniendo una viabilidad mayor al 90%. La evaluación de concentración celular (viables, totales y viabilidad) se realizó cada 18 horas. En la **Figura 7B** se presenta el perfil cinético de crecimiento de las células CHO-DG44. Se determinó que durante 96 horas las células crecen de manera exponencial manteniendo a su vez una viabilidad mayor al 90%. La evaluación de la concentración celular se realizó cada 24 horas. Con los datos de concentración celular viable se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ) en la etapa exponencial así como el tiempo de duplicación (t_d). Ver **Tabla 1**.

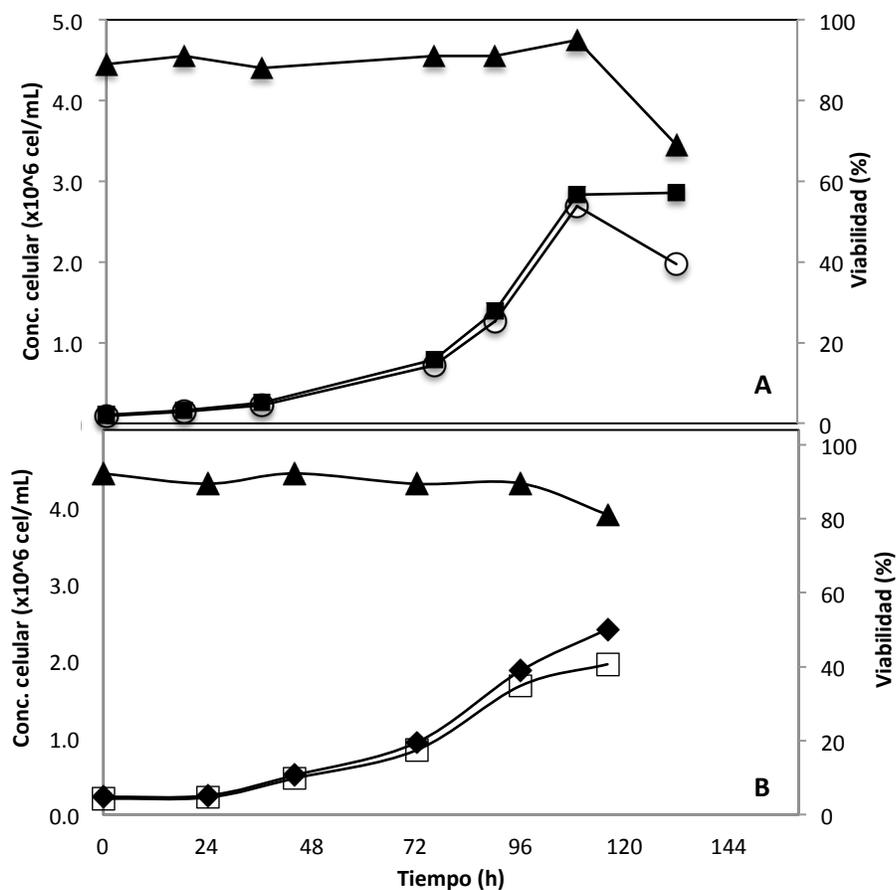


Figura 7. Cinética de crecimiento en minibioreactor instrumentado Applikon de 500 mL. **A)** Perfil cinético de hibridomas BCF2 en medio CD-Hybridoma. Se muestran concentración de células viables (círculos abiertos), concentración celular total (cuadros cerrados) y viabilidad (triángulos cerrados). **B)** Perfil cinético de células CHO-DG44 cultivadas en medio CellVento 100. Se muestran concentración de células viables (cuadros abiertos), concentración celular total (rombos cerrados) y viabilidad (triángulos cerrados).

Tabla 1. Datos cinéticos de la líneas celulares BCF2 y CHO-DG44 crecidas en minibiorreactor Applikon de 500 mL.

Parámetro	Células BCF2	Células CHO-DG44
Conc. celular total máxima ($X_T \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	($2.90 \times 10^6 \pm 0.02$)	($2.41 \times 10^6 \pm 0.02$)
Conc. células viables máxima ($X_V \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	($2.70 \times 10^6 \pm 0.38$)	($1.96 \times 10^6 \pm 0.02$)
Viabilidad máxima (%)	(95 ± 0.33)	(90 ± 0.61) %
Velocidad específica de crecimiento (μ)	(0.031 ± 0.001) h^{-1}	(0.027 ± 0.001) h^{-1}
Tiempo de duplicación (td)	22.4h.	30.1h.

± Representa la desviación estándar (SD) de los conteos realizados por triplicado.

El comportamiento cinético de las células BCF2 y CHO-DG44 en el presente estudio fue similar al reportado para cultivos estáticos (Serrato et al., 2007; Barrios, 2014), sin embargo, se observó que las concentraciones celulares alcanzadas en minibiorreactores fueron mayores debido a que cada una de las variables del cultivo se controlaron en valores predeterminados a partir del software my-Control y el software BioXpert V.2 del sistema de cultivo.

Un segundo objetivo de realizar las cinéticas de crecimiento celular fue determinar el tiempo de cultivo óptimo en que los Hibridomas y las células CHO-DG44 debieron ser cosechadas para realizar las separaciones por elutriación centrífuga a contracorriente. Se decidió cosechar las células a las 96 horas de cultivo, tiempo en el cual la viabilidad era mayor al 90 % y la concentración celular aproximadamente de $1.5 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ en ambos casos.

6.1.2 Determinación de diámetro celular

Se determinó la distribución de tamaño del Hibridoma murino BCF2 y de células CHO-DG44 en crecimiento exponencial no sincronizado empleando un contador electrónico de partículas Coulter Multisizer 3. En la **Figura 8** se muestra la distribución de diámetro relativo determinada para ambas líneas celulares. Dicha determinación sirvió para conocer el rango de tamaño en el que se encontraba la población celular segregada en las diferentes fases del ciclo celular. Así también para estimar, mediante la ecuación simplificada de la Ley de Stokes, los flujos de

elutriación necesarios para separar a las poblaciones en las fases G1, S y G2 del ciclo celular. Se determinó que la distribución de tamaño para células BCF2 y CHO-DG44 se encuentra en un rango de 11-18 μm y 10-20 μm respectivamente. Aun cuando la distribución de tamaño de células CHO con respecto a células BCF2 fue más amplia, el diámetro promedio, la mediana y la moda fueron mayores para BCF2 (12.07, 13.52 y 14.30 μm respectivamente) en comparación a los valores obtenidos para células CHO-DG44 (10.44, 11.7 y 13.23 μm). Conocer la distribución de tamaño de ambas líneas celulares fue de suma importancia en virtud de que las separaciones por elutriación centrífuga a contracorriente se basan en el tamaño de las células (Dorin, 1994).

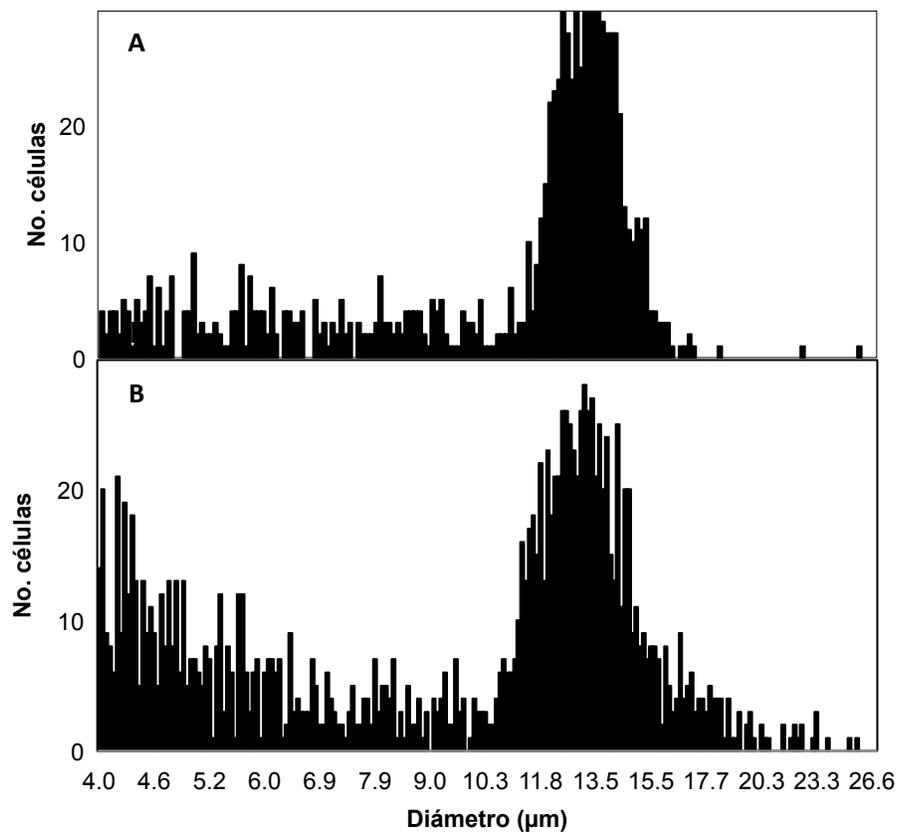


Figura 8. Histograma de la distribución del diámetro celular de: **A**, hibridomas BCF2. **B**, células CHO-DG44.

6.2 Implementación del sistema de cultivo de células sincronizadas en minibiorreactores

6.2.1 Montaje

El sistema de cultivo de células sincronizadas fue implementado a partir del acoplamiento de cuatro elementos principales los cuales se describen a continuación (Véase **Figura 9**).

- El sistema de elutriación centrífuga a contracorriente, en donde se lleva a cabo la separación de las poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular con base en su tamaño, está compuesto por un rotor JE-6B (Bekman Instruments) con cámara de elutriación estándar (1), una ultracentrífuga J2-21 (2) (Beckman Instruments) empleada para otorgar la velocidad de fuerza centrífuga al rotor, una cámara de mezclado (3) que evita que el sistema pueda presurizarse por la entrada de burbujas de aire y una bomba peristáltica MiniPuls 3 (4) (Gilson) que permite generar el flujo de fluido constante del medio de elutriación (5) a través del sistema de elutriación en sentido contrario a la velocidad de fuerza centrífuga.
- Loop de inyección de PVC (Thermo Scientific) de 4 mm de diámetro interno (24.2 m) o de propileno de 7 mm de diámetro interno (7.8 m) (6). La función de este dispositivo fue la inyección del caldo de cultivo de células heterogéneas hacia el sistema de separación celular de tal manera que la inyección de dichas células fuera directa hacia la cámara de elutriación permitiendo con ello que la manipulación de las células fuera la mínima posible y con ello evitar el estrés y daño celular ocasionado por la centrifugación durante la concentración de la población celular a inyectar mediante el sistema tradicional de inyección con jeringa.
- Sistema de cultivo en suspensión en un minibiorreactor instrumentado (Applikon) de 500 mL de volumen nominal (7), operado a 300 mL de volumen de trabajo. En este minibiorreactor se cultivaron las células de forma no sincronizadas con la finalidad de obtener el número de células necesario para realizar la separación celular en las diferentes fases del ciclo celular.

- Sistema de cultivo en suspensión en un minibiorreactor instrumentado (Applikon) de 250 mL de volumen nominal (8), operado a 50 mL de volumen de trabajo. En este minibiorreactor se cultivaron las células sincronizadas en las fase G1 del ciclo celular una vez que se separaron por elutriación y analizadas por citometría de flujo para determinar su pureza.

El acoplamiento de los cuatro elementos antes descritos se llevó a cabo de tal manera que operaciones como la inyección de células o la cosecha de fracciones de células sincronizadas (9) pudiera operarse en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar (no se muestra en el esquema). Las conexiones del sistema se realizaron con Manguera de silicón (Master Flex Cat. No. 96400-16) de 3.1 mm de diámetro interno. Durante la caracterización del sistema se realizaron modificaciones en la longitud de la tubería que conecta la bomba peristáltica hacia el rotor ya que la menor longitud posible es crucial para obtener los flujos constantes requeridos para separar las diferentes poblaciones celulares.

Para el montaje del sistema se acopló una bomba peristáltica diferente a la de un sistema de elutriación tradicional. La bomba empleada genera un flujo de bajo nivel de pulsación del medio de elutriación permitiendo que las perturbaciones dentro de la cámara de elutriación sean mínimas. Cabe mencionar que dicha bomba es digital (en vez de la recomendada por el fabricante del sistema de elutriación Beckman Coulter que utiliza un reóstato análogo), lo que permite incrementar los flujos de la bomba de manera controlada y precisa, disminuyendo las variaciones que pudieran afectar el equilibrio de la cámara de separación. Con lo anterior se logró una mayor reproducibilidad de los resultados (Wahl y Donaldson, 2001).

Kauffman et al., (1990) también realizaron modificaciones a su sistema de elutriación centrífuga de tal manera que las células fueran inyectadas directamente hacia la cámara de elutriación y con ello minimizar la retención de las células en la cámara de mezclado. Sin embargo, sus modificaciones no se hicieron con la intención de llevar a cabo cultivos sincronizados.

Comparando el procedimiento tradicional de elutriación centrífuga a contracorriente, en donde la cantidad de células inyectadas al sistema se ve limitado por el sistema

de cultivo celular estático que se ha empleado; en el sistema desarrollado en el presente trabajo se incorporó el sistema de cultivo de células en minibiorreactores con el cual es posible inyectar altas concentraciones celulares para obtener poblaciones celulares sincronizadas a concentraciones que permiten realizar múltiples muestreos y diferentes determinaciones analíticas. También permite tener un mejor control de las variables medioambientales del cultivo (Fenge y Lullau., 2006).

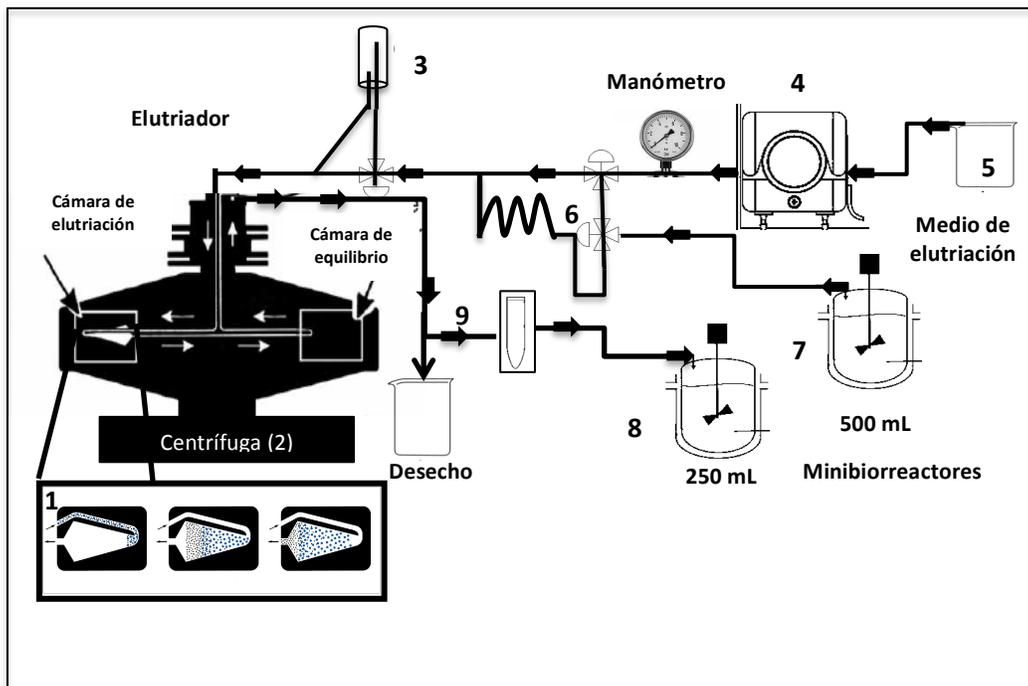


Figura 9. Esquema de sistema de cultivo de células sincronizadas. **1)** Cámara de elutriación estándar. **2)** Ultracentrífuga J2-21 (Beckman Instruments). **3)** Cámara de mezclado **4)** Bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson). **5)** Medio de elutriación. **6)** Sistema de inyección de muestra del reactor hacia la cámara de elutriación (*loop de inyección*). **7)** Minibiorreactor instrumentado (Applikon) de 500 mL. **8)** Minibiorreactor instrumentado de 250 mL. **9)** Cosecha de células sincronizadas o desecho de poblaciones no deseadas.

6.2.2 Caracterización del sistema de fluido

Dado que la separación de las células en las diferentes fases del ciclo celular depende de pequeñas diferencias en su velocidad de sedimentación, el flujo de fluido juega un papel fundamental, por tanto determinar de forma precisa el flujo de fluido

de la bomba peristáltica acoplada al sistema de elutriación fue de suma importancia. Se realizaron curvas de calibración a tres diferentes velocidades de centrifugación y diámetros internos de manguera en el cabezal de la bomba. Se utilizó medio de cultivo DMEM suplementado con 4 mM de L-Glutamina y sin SFB como medio de elutriación. En la primera condición se caracterizó a la bomba con manguera de silicón (Masterflex) de 3.1 mm de DI y a una velocidad de centrifugación de 1000 RPM. La segunda y tercera curvas se realizaron utilizando manguera de PVC (Tygon Thermo Scientific) de 4 mm de DI a 1500 y 2000 RPM. En la **Figura 10** se muestran las curvas de los flujos obtenidos experimentalmente. Se determinó que la bomba peristáltica empleada en el sistema presentó un incremento de flujo lineal a medida que se incrementa la velocidad de la bomba (RPM). Con lo anterior se realizaron los cálculos necesarios para conocer que condiciones en la bomba serían las óptimas para obtener las poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular con mayor pureza de ambas líneas.

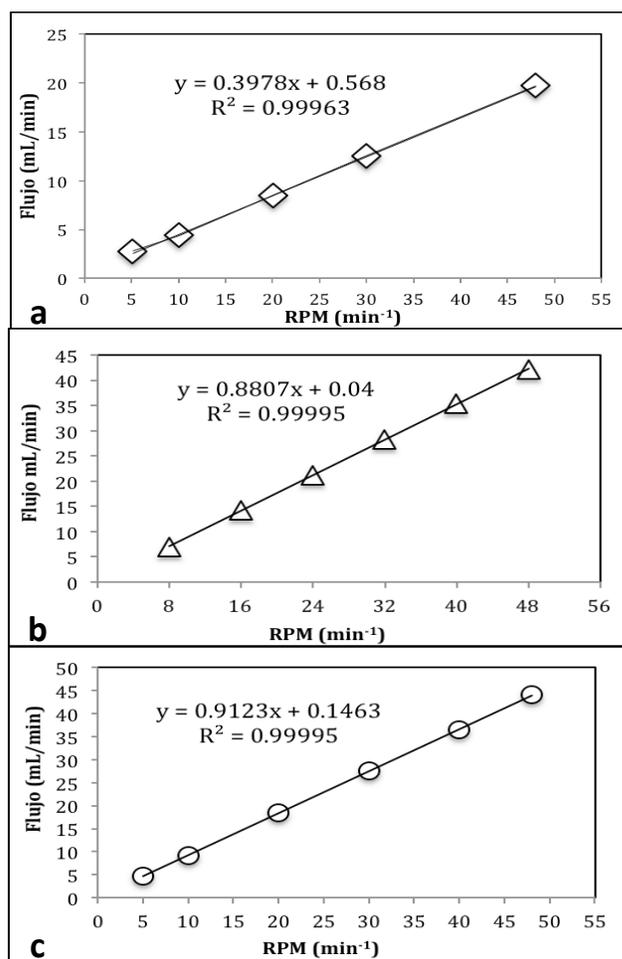


Figura 10 . Curvas de calibración de bomba peristáltica Minipuls 3. **a)** Curva de calibración con manguera de silicón de pared delgada de 3.1 mm de ID, velocidad de rotor de 1000 rpm. **b)** Curva de calibración con manguera Tygon pared delgada de 4 mm de ID, velocidad de rotor 1500 rpm. **c)** Curva de calibración con manguera Tygon pared delgada de 4 mm de ID, velocidad de rotor 2000 rpm

6.2.3 Cálculo teórico del diámetro de las células CHO-DG44 y BCF2 que se pueden separar a diferentes flujos de fluido empleando la ley de Stokes simplificada.

Una vez determinado experimentalmente el tamaño de las células y el rango de flujo que la bomba peristáltica podía otorgar en las diferentes condiciones de trabajo, se realizaron los cálculos teóricos (a partir de la ecuación simplificada de la ley de Stokes) de los diámetros de las poblaciones celulares que podíamos separar a velocidades de flujo de fluidos determinadas. Lo anterior con la finalidad de establecer de forma precisa los rangos de flujo necesarios para separar con alta pureza a las poblaciones celulares de interés.

Con ayuda de la ecuación de la recta de las curvas de calibración de la bomba peristáltica se realizaron las conversiones a RPM que nos otorgaría los flujos determinados para separar a las poblaciones celulares de interés. En la **Tabla 2** se muestran los diámetros calculados a partir de los flujos otorgados por la bomba en las diferentes condiciones de operación del sistema de elutriación.

Tabla 2. Diámetros obtenidos en las diferentes velocidades de fuerza centrífuga.

Velocidad de fuerza centrífuga (RPM)					
1000		1500		2000	
Flujo (mL min ⁻¹)	Diámetro (µm)	Flujo (mL min ⁻¹)	Diámetro (µm)	Flujo (mL min ⁻¹)	Diámetro (µm)
9	13.3	13	10.6	29	11.9
9.5	13.6	14	11.0	30	12.1
10	14.0	16	11.8	31	12.3
11	14.7	18	12.5	32	12.5
12	15.3	20	13.2	33	12.7
13	16.0	22	13.8	34	12.9
14	16.6	24	14.5	35	13.1
15	17.1	26	15.0	36	13.3
16	17.7	28	15.6	37	13.5
17	18.2	30	16.2	38	13.6
18	18.8	32	16.7	39	13.8
19	19.3	34	17.2	40	14
20	19.8	36	17.7	41	14.2
21	20.3	38	18.2	42	14.3

Se determinó que al incrementar la velocidad de rotor es necesario incrementar de forma importante el flujo de medio de elutriación para mantener el equilibrio del sistema y separar a una población de determinado diámetro (Ver **Tabla 2**). Si el sistema de separación celular opera a 1000 RPM de velocidad de centrifugación del rotor, el consumo total de medio de elutriación es mucho menor en comparación al consumo a velocidades de centrifugación de 1500 RPM y superiores. Sin embargo a 1000 RPM el sistema es menos estable en virtud de que el equilibrio generado por el flujo de fluido en contra de la fuerza centrífuga se pierde fácilmente con mínimas perturbaciones como el encendido del sistema de refrigeración, vacío y vibraciones de la ultracentrífuga, por tanto, las poblaciones celulares separadas no presentan buena resolución. A 1500 y 2000 RPM el sistema de elutriación mostró ser robusto y permitió obtener con mayor pureza a las poblaciones elutriadas de interés.

Los perfiles de separación observados en las **Figuras 11 y 17**, realizados a 1500 RPM y 2000 RPM respectivamente, los restos celulares se separaron completamente de la población sincronizada en la fase G1 del ciclo celular, por tanto, al realizar el análisis de contenido de DNA el porcentaje de pureza de la población fue mayor al 90%. Por el contrario, se determinó que a 1000 RPM, en el caso particular de hibridomas BCF2 (**Figura 19 del Anexo I**), la resolución de los perfiles de ciclo celular de la población sincronizada en la fase G1 se contaminó con el contenido de DNA de los restos celulares que no se lograron separar de la población, por lo tanto, el porcentaje de pureza de dicha población fue menor (en promedio 86 %).

6.2.4 Determinación y Evaluación de las condiciones de sincronización del sistema de Elutriación Centrífuga acoplado a un minibiorreactor instrumentado.

Se realizaron tres separaciones de células no sincronizadas de Hibridoma murino BCF2, a 1000, 1500 y 2000 RPM de velocidad de centrifugación para determinar las condiciones óptimas de sincronización en que se obtendría a la población en la fase de G1 del ciclo celular con mayor pureza. Dicha población sería posteriormente puesta en cultivo para realizar cinéticas de crecimiento celular sincronizado. En el **Apartado 6.2.4.1** se muestra la separación a 1500 RPM como representativa y en el

Anexo I se muestran las dos separaciones restantes. En el caso de células CHO-DG44 se hicieron cinco separaciones a 1000 y 1500 RPM con el mismo objetivo. En el **Apartado 6.2.4.2** se muestra la separación a 1500 RPM como representativo y en el **Anexo II** se muestran las cuatro separaciones restantes.

6.2.4.1 Separación de células de Hibridoma murino BCF2 sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular.

Se separó una población heterogénea de células BCF2 en 22 fracciones de acuerdo a las condiciones establecidas en la **Tabla 3**. En la **Figura 11** se muestra el perfil de contenido de DNA determinado para cada una de las fracciones separadas.

Tabla 3. Flujos y Diámetros determinados para obtener poblaciones de células BCF2 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.

Fración	Flujo (mL min⁻¹)	Diámetro (µm)
1	16-17	11.8-12.2
2	17-18	12.2-12.5
3	18-19	12.5-12.9
4	19-20	12.9-13.2
5	20-21	13.2-13.5
6	21-22	13.5-13.8
7	22-23	13.8-14.1
8	23-24	14.1-14.4
9	24-25	14.4-14.7
10	25-26	14.7-15.0
11	26-27	15.0-15.3
12	27-28	15.3-15.6
13	28-29	15.6-15.9
14	29-30	15.9-16.2
15	30-31	16.2-16.4
16	31-32	16.4-16.7
17	32-33	16.7-16.9
18	33-34	16.9-17.2
19	34-35	17.2-17.4
20	35-36	17.4-17.7
21	36-37	17.7-17.9
22	37-38	17.9-18.2

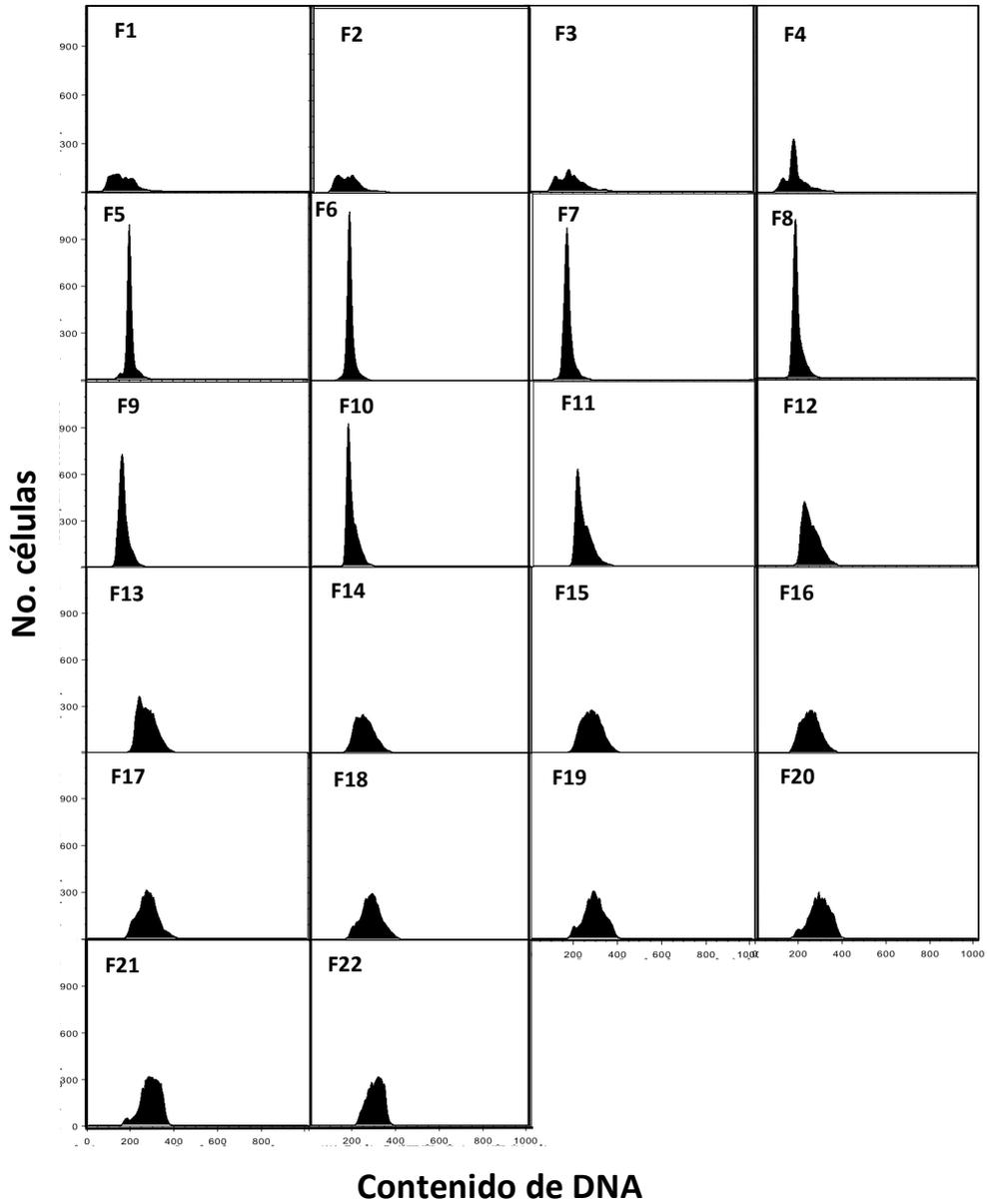
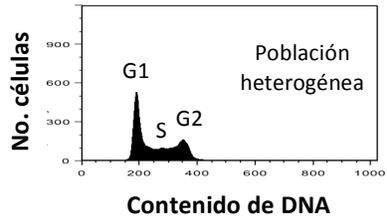


Figura 11. Poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular de células de Hibridoma murino BCF2 obtenidas a 1500 RPM.

De acuerdo al análisis del porcentaje relativo de células en cada fase del ciclo celular de las fracciones separadas a 1500 RPM (**Figura 11**) se determinó que a partir de la fracción 5 y hasta la fracción 10 (véase **Figura 12**) la cantidad de células en la fase G1 es mayoritaria, sin embargo, en las fracciones 8 a 10 el porcentaje de células en la fase S podría comprometer la sincronía de dichas células en cultivo, por lo tanto, dichas fracciones no se consideraron adecuadas para realizar cultivos sincronizados a partir de células en la fase G1. También se determinó que a 1500 RPM el sistema no fue capaz de separar células en las fases S y G2 con alta pureza, sin embargo, a un flujo entre 27-31 mL min⁻¹ correspondiente a un rango de 15.3-16.4 μm (fracciones 12 a 15) la población fue enriquecida en la fase S del ciclo celular y a un flujo entre 34-38 mL min⁻¹ correspondiente a un rango de 17.2-18.2 μm (fracciones 19 a 22) se obtuvo una población enriquecida en la fase G2.

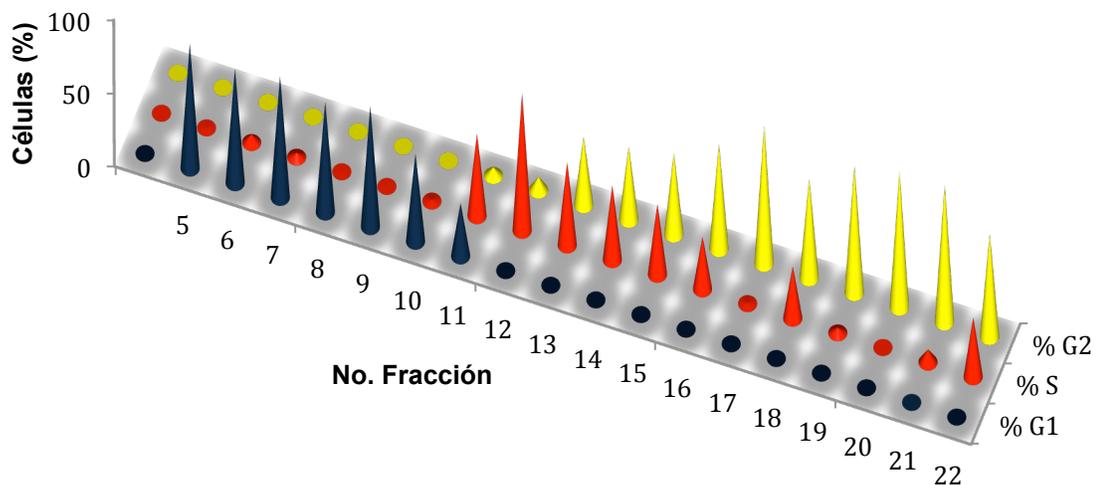


Figura 12. Análisis de ciclo celular de las fracciones colectadas en la separación a 1500 RPM de células de Hibridoma Murino BCF2.

Con respecto a las tres separaciones realizadas, se determinó que las condiciones óptimas de sincronización para obtener a la población en la fase G1 con alta pureza de hibridomas BCF2 fueron: velocidad de centrifugación de 1500 rpm con flujos de

20-23 mL min⁻¹ correspondiente a un rango de 13.2-14.1 μm o 2000 rpm con flujos de 36-40 mL min⁻¹ correspondiente a un rango de 13.3-14.0 μm¹

6.2.4.2 Separación de células CHO-DG44 sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular.

Se separó una población heterogénea de células CHO-DG44, en 12 fracciones de acuerdo a las condiciones establecidas en la **Tabla 4**. En la **Figura 13** se muestra el perfil de contenido de DNA para cada una de las fracciones separadas.

Tabla 4. Flujos y Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.

Fracción	Flujo (mL min ⁻¹)	Diámetro (μm)
1	13-14	10.6-11
2	14-16	11-11.8
3	16-18	11.8-12.5
4	18-20	12.5-13.2
5	20-22	13.2-13.8
6	22-24	13.8-14.5
7	24-26	14.5-15
8	26-28	15-15.6
9	28-30	15.6-16.2
10	30-32	16.2-16.7
11	32-34	16.7-17.2
12	34-36	17.2-17.7

De las cinco separaciones realizadas se determinó que las condiciones óptimas para sincronizar células CHO-DG44 en la fase G1 del ciclo celular con alta pureza fueron: velocidad de centrifugación de 1500 RPM y flujos en un rango de 13-18 mL min⁻¹ correspondientes a un rango de tamaño de 10.6-12.5 μm como se muestra en la **Figura 13** (fracciones 1-3). El sistema no fue capaz de separar células en las fases S y G2 con alta pureza, pero además, la agregación de las células no permitió enriquecer a las poblaciones en las fases S y G2 como ocurrió en células BCF2.

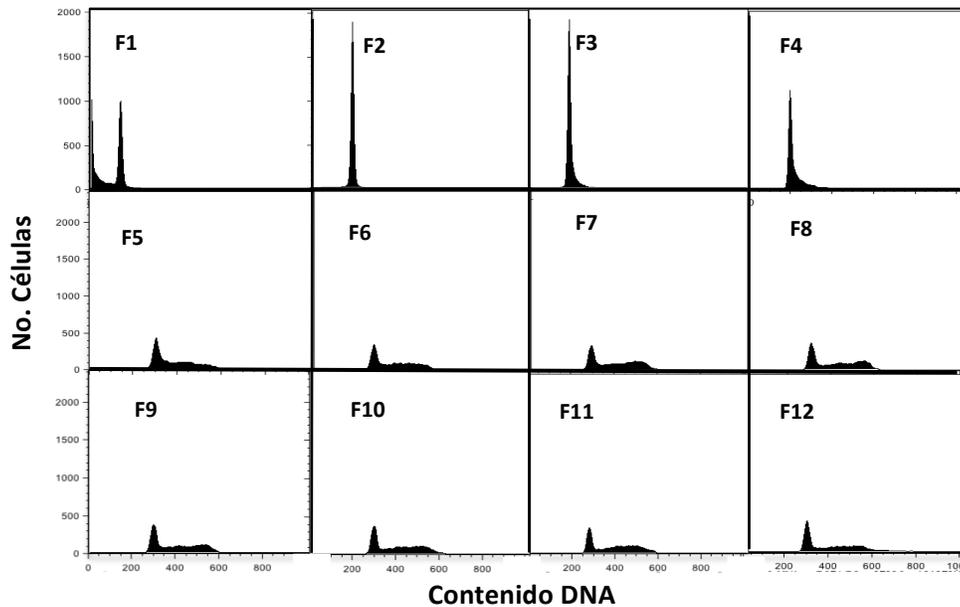
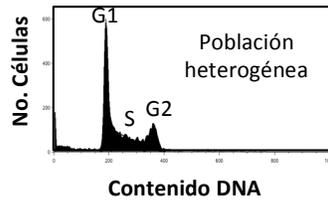


Figura 13. Poblaciones celulares en las diferentes fases de ciclo de células de CHO-DG44 separadas a 1500 RPM.

El sistema de separación de células animales sincronizadas acoplado al minibiorreactor permitió obtener poblaciones en las diferentes fases del ciclo celular en ambas líneas celulares, sin embargo, solamente las células en la fase G1 del ciclo celular pudieron obtenerse con alta pureza. El sistema implementado posee ventajas importantes respecto de trabajos realizados anteriormente (Kauffman et al. 1990; Lloyd et al. 2000; Whal y Donaldson 2001). Se puede operar en condiciones asépticas de tal manera que las fracciones celulares de interés pueden ser cultivadas nuevamente bajo condiciones de cultivo controladas. También, las concentraciones celulares que se alcanzan con el cultivo heterogéneo en minibiorreactor permiten obtener mayores concentraciones de células sincronizadas después de la separación.

6.2.4.3 Evaluación del rendimiento de las separaciones empleando células BCF2 y CHO-DG44

Se realizaron 3 separaciones del Hibridoma BCF2 a 1000, 1500 y 2000 RPM con inyecciones de 80×10^6 , 300×10^6 y 137×10^6 células respectivamente. Se realizaron 5 separaciones de células CHO-DG44; dos repeticiones a 1500 RPM con inyecciones de 71 y 89×10^6 células, una separación a 1500 RPM con 306×10^6 células, una separación a 1000 RPM con 116×10^6 células y una separación a 1500 RPM con 546×10^6 para determinar el rendimiento del sistema. En la **Tabla 5** se muestran los rendimientos de células en la fase G1 del ciclo celular obtenidos de cada separación. Se determinó que la inyección de hibridomas BCF2 no sincronizados en un rango de $1-3 \times 10^8$ células (con velocidades de centrifugación entre 1000 y 1500 RPM) da un rendimiento aproximado del 30 % de células en la fase G1 del ciclo celular con alta pureza con respecto a la población total inyectada. Dicho porcentaje fue cercano al rendimiento máximo teórico (30-35 % de la población total) de células en la fase G1 del ciclo celular que se pueden obtener de una población no sincronizada en crecimiento exponencial.

En el caso de células CHO-DG44 no se determinó una concentración de células heterogéneas específica de inyección porque debido a su naturaleza adherente los rendimientos en cada separación variaron considerablemente. Un rango aproximado de inyección de una población heterogénea de células CHO sería el mismo que para células BCF2.

Tabla 5. Rendimiento celular obtenido después de emplear el sistema de elutriación centrífuga acoplado a un minibioreactor instrumentado en células BCF2 y CHO-DG44.

Línea celular	No. Barrido	Células totales inyectadas	Células totales recuperadas	Células en G1	Rendimiento cel. totales (%)	Rendimiento cel. G1 (%)
BCF2	1*	3.00x10 ⁸	2.42x10 ⁸	0.81x10 ⁸	80.7	27.0
	2**	0.80x10 ⁸	0.76x10 ⁸	0.25x10 ⁸	94.6	31.2
	3***	1.37x10 ⁸	1.15x10 ⁸	0.07x10 ⁸	84.0	5.1
CHO DG44	1	3.06x10 ⁸	1.61x10 ⁸	0.57x10 ⁸	52.6	18.6
	2	0.71x10 ⁸	0.51x10 ⁸	0.10x10 ⁸	71.1	14.1
	3	0.89x10 ⁸	0.53x10 ⁸	0.04x10 ⁸	59.1	4.5
	4	1.16x10 ⁸	0.92x10 ⁸	0.007x10 ⁸	79.1	0.6
	5	5.46x10 ⁸	2.73x10 ⁸	0.53x10 ⁸	50.1	9.7

* Barrido a 1500 RPM 37 °C.; **Barrido a 1000 RPM 37 °C con PBS 1X. ; *** Barrido a 2000 RPM 37 °C. 1,2,3 y 5, Barridos a 1500 RPM 28 °C; 4, Barrido a 1000 RPM 28 °C.

Con la finalidad de evaluar si la cámara de elutriación permitía separar una alta concentración celular en las diferentes fases de ciclo celular con alta pureza, se realizó el análisis de contenido de DNA a cada una de las fracciones obtenidas de la separación de 5.46x10⁸ células CHO-DG44 a 1500 RPM. En la **Tabla 6** se muestra el porcentaje de células en las fases G1, S y G2 obtenidas en cada una de las fracciones colectadas así como el porcentaje de células recuperadas.

Tabla 6. Análisis de contenido de DNA y células recuperadas en cada una de las fracciones elutriadas a 1500 RPM de la inyección de 5.46×10^8 células CHO-DG44.

Fracción	Flujo (mL min ⁻¹)	No. de células ($\times 10^8$) ^b	% Células recuperadas	%G1 ^a	%S ^a	%G2 ^a
Control		5.5	50.1	34.9	51.1	12.1
1	10-11	0.13	2.4	75.3	23.6	0
2	11-12	0.4	7.3	61.7	37	0
3	12-13	0.31	5.6	46.3	53.2	0
4	13-14	0.22	4	5.5	80.5	2.47
5	14-16	0.23	4.2	10.1	73.6	2.72
6	16-18	0.25	4.5	2.62	67.3	3.28
7	18-20	0.24	4.4	5.9	81.4	4.35
8	20-22	0.19	3.5	37.2	61.1	1.02
9	22-24	0.19	3.5	0	36.1	68.1
10	24-26	0.15	2.7	0	39.5	64.9
11	26-28	0.13	2.4	0	54.7	39.5
12	28-30	0.11	2	0	43.6	53.1
13	30-32	0.1	1.8	0	0	96.8
14	32-34	0.07	1.3	0	0	90.2
15	34-36	0.07	1.3	44.9	33.2	19.8
16	36-38	0.04	0.73	0	31.1	64.5

^a Porcentaje de contenido de DNA de las células colectadas en cada fracción.

^b Conteo de células en cada una de las fracciones por citometría de flujo a una velocidad de $12 \mu\text{L min}^{-1}$

El análisis de ciclo celular mostrado en la tabla 6 reflejó en términos generales que con el sistema de cultivo de células animales sincronizadas desarrollado no es posible separar concentraciones celulares del orden de 5×10^8 células. Durante el proceso de separación una alta concentración de células dentro de la cámara en conjunto con las alteraciones inherentes del equilibrio del sistema provoca que las poblaciones se mezclen y como resultado la pureza de las mismas se vea afectada. Cabe mencionar que la evaluación se realizó con células CHO (de naturaleza adherente) y por tanto esto último pudo ser un factor que contribuyó a la baja resolución de los perfiles de ciclo celular obtenidos.

6.3 Evaluación de la pureza de una población sincronizada en la fase G1 de células BCF2 y CHO-DG44

Las condiciones de sincronización más adecuadas para obtener a una población en la fase G1 de ciclo celular de células BCF2 y CHO-DG44 con alta pureza fueron 1500 RPM, 28°C y una concentración máxima de 3×10^8 células. En la **Figura 14** se muestra el análisis de contenido de DNA de una población heterogénea y una sincronizada en la fase G1 del ciclo celular en ambas líneas celulares. En la **Tabla 7** se muestra el porcentaje de pureza de dichas poblaciones separadas.

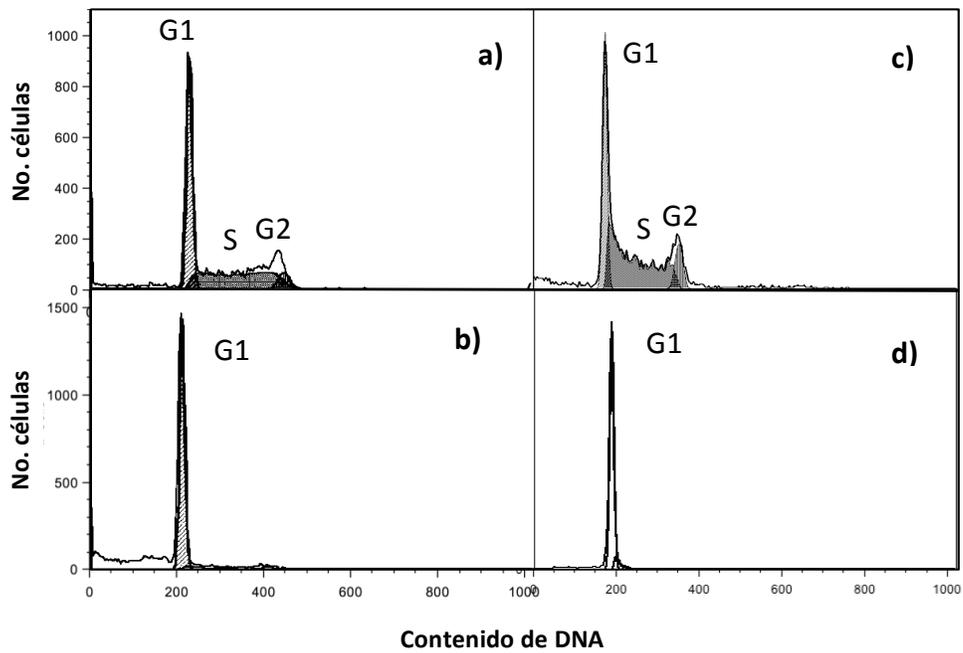


Figura 14. Análisis de contenido de DNA por citometría de flujo de una población de Hibridomas BCF2 no sincronizada (a) y sincronizada (b) así como de una población de células CHO-DG44 no sincronizada (c) y sincronizada (d).

Tabla 7. Análisis de contenido de DNA de una población heterogénea y una población homogénea empleando el modelo matemático Dean-Jett-Fox y Watson Pragmático.

Línea Celular	Condición	Fase de ciclo (%)		
		G1	S	G2
BCF2	*Control	30±1.8	52.9±6.6	15.9±6.9
	^Población sincronizada	95.2±2.9	5.1±3.4	1.1±0.8
CHO-DG44	*Control	33.1±2.8	52.4±3	11.9±0.4
	^Población sincronizada	88.7±5.5	6.8±2.5	4.4±2.9

± Representa la desviación estándar (SD) de la pureza de las poblaciones determinadas en 5 repeticiones (contenido de DNA).

*Estimado utilizando el modelo Dean-Jett-Fox

^Estimado usando el modelo Watson Pragmático

Se observa que sistema de cultivo de células animales sincronizadas desarrollado fue capaz de separar poblaciones en la fase G1 del ciclo celular con pureza alrededor del 90 % en comparación al porcentaje máximo de células en la fase G1 de una población heterogénea que fue de aproximadamente 30-35%.

La determinación del porcentaje de pureza de las poblaciones sincronizadas en fase G1 mediante la aplicación de un modelo matemático no siempre fue aplicable y en la mayoría de los casos subestimó la pureza de la población en virtud de asignar siempre un porcentaje a células en fases S y G2.

En los casos en que el modelo matemático no pudo ser aplicado, se introdujo una restricción que considera que el contenido de DNA del pico de G1 fue la mitad del contenido de DNA del pico de G2 (no detectable). Se propone realizar un análisis del perfil de ciclinas específicas que se expresan en cada una de las fases del ciclo para determinar con mayor precisión la pureza de las poblaciones sincronizadas.

6.4 Cinéticas de ciclo celular en minibioreactor de una población sincronizada de Híbridomas BCF2 en la fase G1 del ciclo celular.

Una vez realizada la separación de una población heterogénea de células BCF2 y habiendo colectado las fracciones en las cuales se encontró a la población G1, se les realizó el análisis de contenido de DNA a cada una para seleccionar las de mayor pureza. Se realizó un cultivo en minibioreactor instrumentado de 250 mL de volumen

nominal de una población sincronizada en la fase G1 con una pureza de 90.6 % a una concentración de 0.3×10^6 cel mL⁻¹ en 50 mL de medio de cultivo. El cultivo se siguió, haciendo un muestreo cada 2 horas durante 48 horas para evaluar el crecimiento sincronizado de la población además de la determinación de la concentración de metabolitos consumidos (Glutamina y Glucosa) y producidos (Lactato). En la **Figura 15** se muestra la cinética de crecimiento obtenida y los perfiles de consumo y producción de metabolitos.

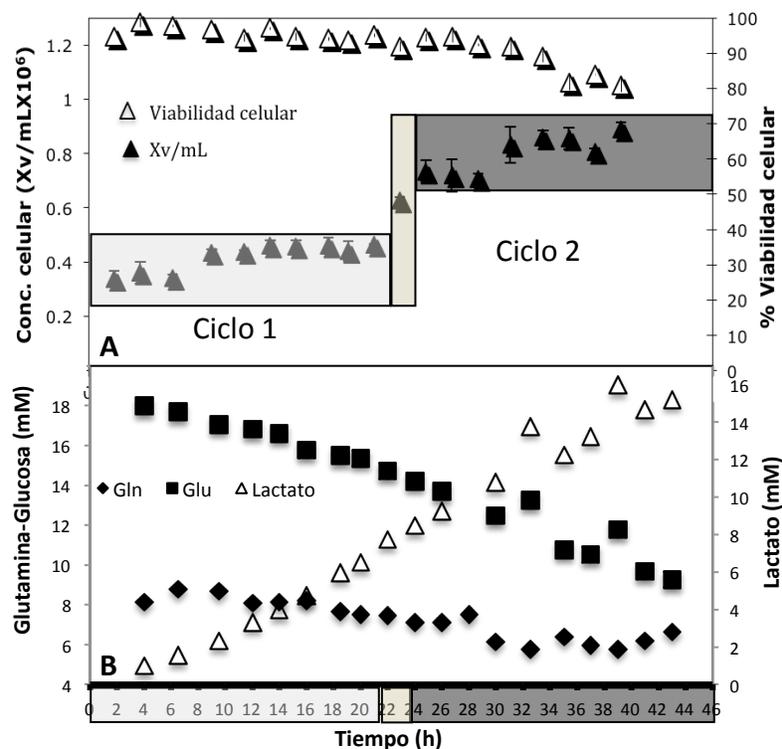


Figura 15. Cultivo en minibioreactor de células BCF2 sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular. **A.** Cinética de crecimiento celular. Se muestra concentración de células vivas (triángulos cerrados) y viabilidad celular (triángulos abiertos); en el recuadro gris se observa el primer ciclo de crecimiento celular y el mantenimiento de la sincronía, en el recuadro marrón se indica el tiempo de duplicación y en el recuadro negro se indica el segundo ciclo de crecimiento. **B.** Cinética de consumo y producción de metabolitos. Se muestra la producción de lactato (triángulos abiertos), consumo de glutamina (cuadros cerrados) y consumo de glucosa (rombos cerrados).

La cinética de crecimiento celular de Hibridomas BCF2 sincronizados en la fase G1 del ciclo celular mostró un perfil de crecimiento escalonado durante aproximadamente dos ciclos (**Figura 15-A**), que fue el tiempo que se muestreó el biorreactor. Además, cumplió con tres de los criterios de sincronización descritos por Keyomarsi et al., (1991) y Cooper y Shadden (2003). El primero de ellos fue el tiempo de duplicación; las células sincronizadas se duplicaron en un tiempo similar al de una población heterogénea en crecimiento exponencial correspondiente a 22-24 horas. El segundo criterio fue que durante la interfase los incrementos en la concentración celular que se presentaron no fueron considerables. Finalmente el tercer criterio fue que después del proceso de sincronización el crecimiento de las células no se vio afectado, lo cual se reflejó en la viabilidad del cultivo. Es importante mencionar que el consumo y producción de metabolitos fue verificable a concentraciones de $0.3-0.4 \times 10^6$ cel mL⁻¹ (**Figura 15-B**), sin embargo, se requiere de concentraciones celulares mas grandes para poder observar diferencias en las velocidades de consumo y producción de metabolitos en cada fase del ciclo celular.

En la **Figura 16** se muestran los perfiles de las variables medioambientales de cultivo que fueron controladas durante el crecimiento sincronizado de células BCF2.

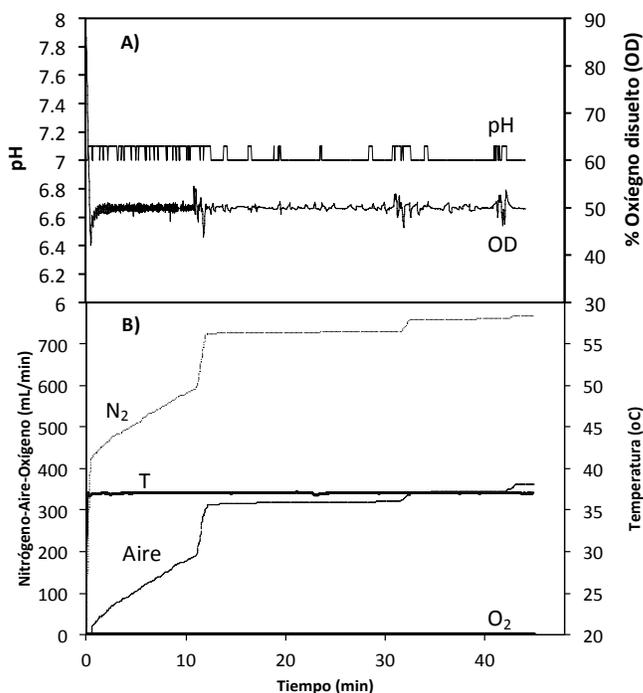


Figura 16. Control de las variables de cultivo en minibioreactor de células BCF2 sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular. **A.** Control de pH y OD. **B.** Control del flujo de gases de alimentación Nitrógeno, Aire y Oxígeno y control de la temperatura.

Se realizó un segundo cultivo de células sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular. Después de la elutriación de la población de células no sincronizadas se seleccionó una población sincronizada en la fase G1 cuya pureza fue de 92.2 %. En dicho cultivo se empleó como medio de elutriación PBS 1X más mezcla de nutrientes HAM F-12. Al igual que en el primer cultivo sincronizado, las células se cultivaron en minibiorreactor de 250 mL de volumen nominal a una concentración de 0.5×10^6 cel mL^{-1} en 50 mL de volumen de medio de cultivo. En la **Figura 17-A** se muestra el perfil de crecimiento celular y en la **Figura 17-B** los perfiles de consumo de Glucosa y L-Glutamina y producción de Lactato.

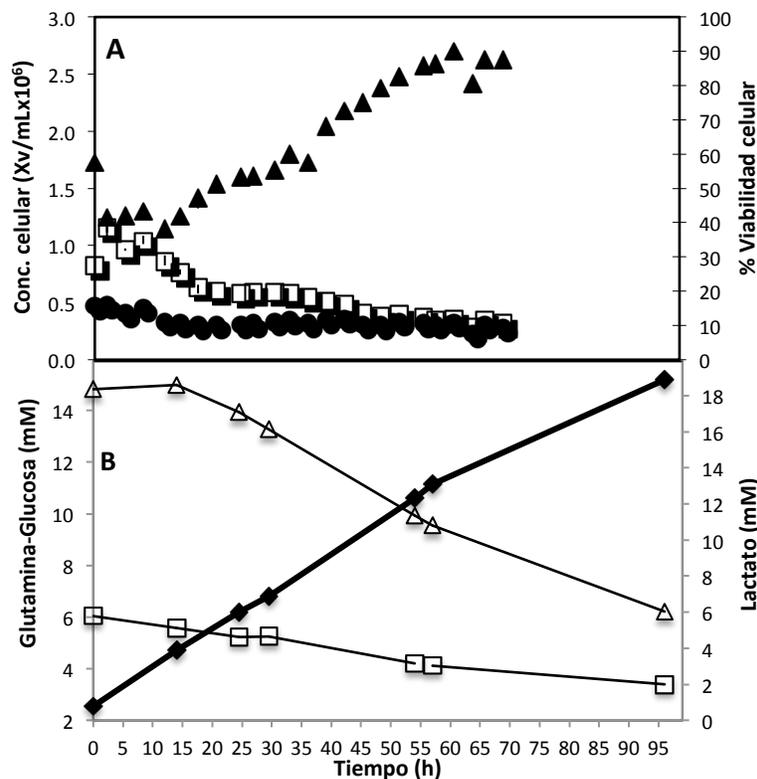


Figura 17. Cultivo en minibiorreactor de células BCF2 sincronizadas en la fase G1 de ciclo celular. **A.** Cinética de crecimiento celular. Se muestra concentración de células vivas (círculos cerrados), células totales (cuadros abiertos) y viabilidad celular (triángulos cerrados). **B.** Perfiles de consumo y producción de metabolitos. Se muestra la producción de lactato (cuadros cerrados), consumo de glutamina (cuadros abiertos) y consumo de glucosa (triángulos abiertos).

Como se observa en la **Figura 17-A**, la población sincronizada en la fase G1 del ciclo celular con alta pureza se mantuvo arrestada durante 67 horas, tiempo en el cual es muy probable que las células muertas hayan sido desintegradas provocando un incremento en la viabilidad del cultivo. Probablemente el medio de elutriación empleado (PBS 1X más HAM) fue el responsable de que las células se mantuvieran arrestadas. Sin embargo, se hipotetiza que la fracción de células sincronizadas en G1 con alta pureza que se seleccionó pudo contener un porcentaje mayoritario de células en fase G0, las cuales no tuvieron capacidad para salir del arresto. Una propuesta para determinar si durante la separación de la población celular en la fase G1 se obtiene un porcentaje importante de células en la fase G0 es evaluar la capacidad de proliferación de las células a partir de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU). En la **Figura 17-B** se muestra que las células aún arrestadas en la fase G1 del ciclo celular mostraron un perfil de consumo y producción de metabolitos.

En la **Figura 18** se muestran los controles de las variables medioambientales del cultivo sincronizado de células BCF2 en la fase G1 del ciclo celular.

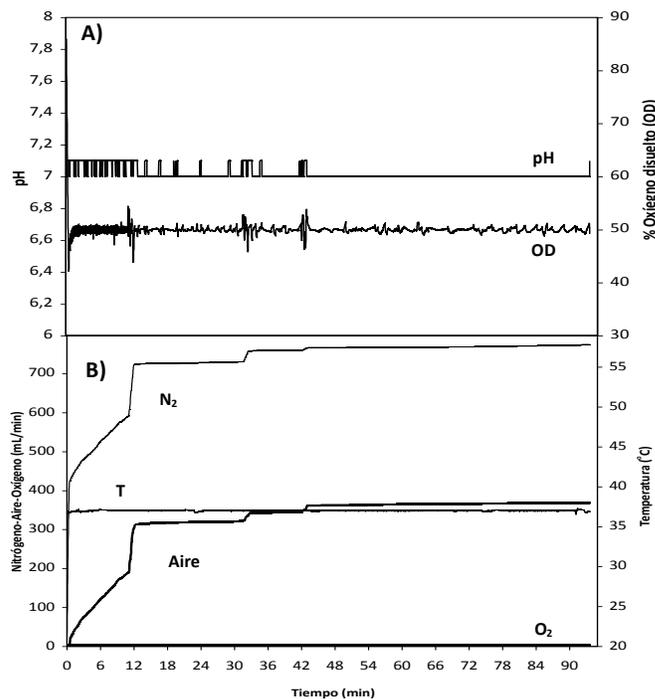


Figura 18. Control de las variables de un cultivo en minibiorreactor de un cultivo de células BCF2 sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular. **A)** Control de pH y OD. **B)** Control de gases Nitrógeno, Aire y Oxígeno y control de la temperatura.

Cabe señalar que realizar cultivos celulares sincronizados en minibiorreactores en comparación con cultivos en sistemas estáticos permitió tomar muestras del cultivo en volúmenes suficientes para llevar a cabo determinaciones analíticas, en este caso determinación de la producción y consumo de metabolitos cada 2-3 horas, lo cual en un cultivo estático no es posible realizar.

Con el sistema desarrollado en el presente proyecto es posible realizar estudios detallados, en las diferentes fases del ciclo celular, de los procesos implicados en la calidad y cantidad de las proteínas recombinantes producidas por cultivo celular. Lloyd et al. (2000), por ejemplo, proponen que la velocidad específica de producción de proteínas esta estrechamente relacionada con el tamaño de las células independientemente de la fase del ciclo celular en que se encuentren. Si bien el tamaño celular es el principal responsable de que haya una mayor velocidad específica de producción, el ciclo celular esta íntimamente relacionado ya que el tamaño de las células es proporcional a la fase de ciclo celular. Con el sistema desarrollado se puede estudiar dicho fenómeno. Además, si se desea obtener células sincronizadas en la fase de mayor producción de proteína recombinante, que según Lloyd et al. (2000) es la fase G2/M, con el sistema desarrollado es posible separar a la población en la fase G1 del ciclo celular con alta pureza y realizar cultivos sincronizados hasta alcanzar la fase G2/M.

7. Conclusiones

- Se implementó un sistema de cultivo de células animales sincronizadas en minibiorreactor bajo condiciones de cultivo controladas. Sin embargo, el control riguroso de cada variable fue indispensable para que el sistema operase de manera exitosa.
- El sistema fue probado con células CHO-DG44 y células de hibridoma murino BCF2, estableciendo como condiciones óptimas de sincronización 1500 RPM de velocidad de centrifugación y un rango de concentración celular de inyección de células no sincronizadas de entre $1-3 \times 10^8$ células.
- Se sincronizaron células en la fase G1 del ciclo celular con alta pureza de células BCF2 y CHO-DG44, sin embargo, no fue posible obtener células sincronizadas con alta pureza en las fases S y G2 del ciclo celular .
- Se realizaron cultivos sincronizados en minibiorreactor bajo condiciones de cultivo controladas de células de Hibridoma murino BCF2 a concentraciones celulares entre 0.3 a 0.5×10^6 células mL^{-1} y volúmenes de operación de 50 mL.
- En los cultivos sincronizados fue posible realizar determinaciones analíticas como el conteo celular para la cinéticas de crecimiento y determinaciones de metabolitos Glucosa, Glutamina y Lactato para el perfil metabólico con intervalos de muestreo cada 2 a 3 horas durante tiempos de cultivo de 44 a 66 horas. A tales concentraciones celulares sin embargo no fue posible observar diferencias en los perfiles de metabolitos en las diferentes fases del ciclo celular.

8. Perspectivas

Realizar cultivos sincronizados de células CHO e Hibridomas BCF2, a concentraciones celulares que permitan mediante el análisis del consumo y producción de metabolitos, determinar si existen diferencias en las velocidades de consumo y producción de metabolitos en las diferentes fases del ciclo celular.

Determinar, mediante análisis de apoptosis y capacidad proliferativa, la calidad de las poblaciones de células sincronizadas generadas en el sistema de cultivo desarrollado en el presente proyecto.

Determinar mediante análisis de expresión de ciclinas, el porcentaje de pureza de las poblaciones celulares sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular.

9. Anexos

9.1 Anexo I. Barridos (separaciones) de células de Hibridoma Murino BCF2

En las **Figuras 19 y 20** se muestran los perfiles de ciclo celular de las poblaciones celulares separadas a 1000 y 2000 RPM de velocidad centrífuga respectivamente para determinar el rendimiento del sistema de cultivo de células animales sincronizadas. En las **Tablas 9 y 10** se muestran los flujos empleados para obtener a las poblaciones en las diferentes fases del ciclo celular de células BCF2.

* Barrido a 1000 RPM

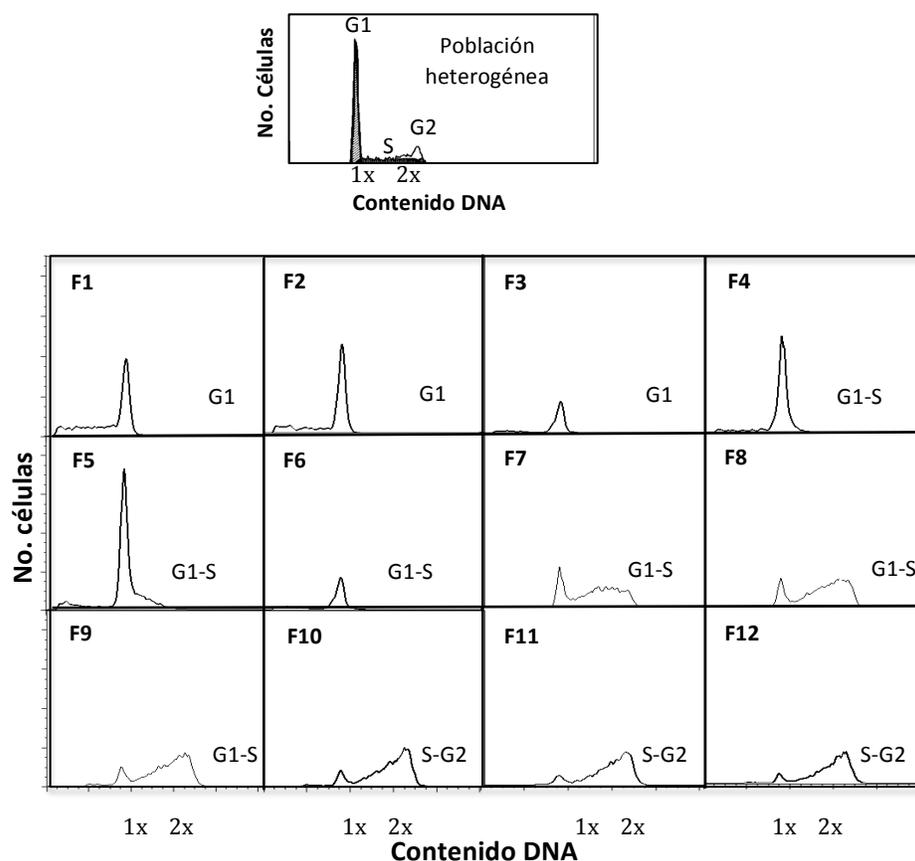


Figura 19. Barrido del contenido de DNA de células de Hibridoma murino BCF2 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1000 RPM.

Tabla 8. Diámetros determinados para obtener poblaciones de células BCF2 a 1000 rpm en las diferentes fases del ciclo celular.

No. Fracción	Flujo (mL min ⁻¹)	Diámetro (μm)
1	9-9.5	13.3-13.6
2	9.5-10	13.6-14
3	10-11	14-14.7
4	11-12	14.7-15.3
5	12-13	15.3-16
6	13-14	16-17.1
7	14-15	17.1-17.7
8	15-16	17.7-18.2
9	16-17	18.2-18.8
10	17-18	18.8-19.3
11	18-19	19.3-19.8
12	19-21	19.8-20.3

- **Barrido a 2000 RPM**

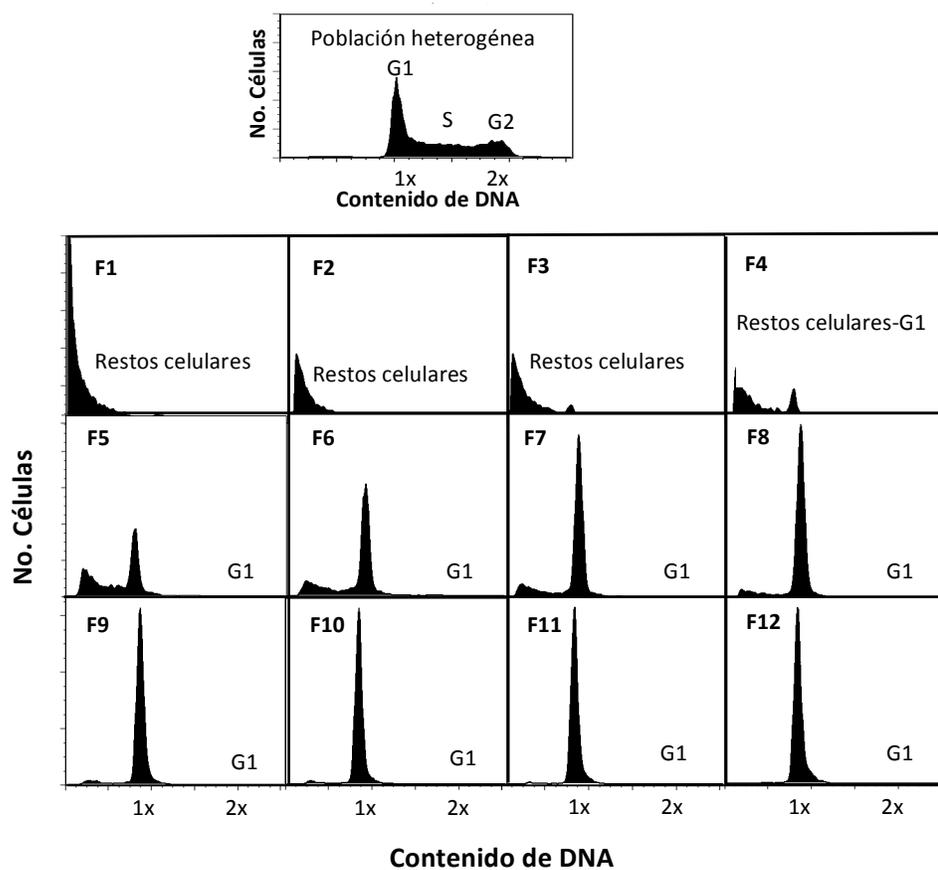


Figura 20. Barrido del contenido de DNA de células de Hibridoma murino BCF2 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 2000 RPM.

Tabla 9. Diámetros determinados para obtener poblaciones de células BCF2 a 2000 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.

No. Fracción	Flujo (mL min⁻¹)	Diámetro (µm)
1	31-32	12.3-12.5
2	32-33	12.5-12.7
3	33-34	12.7-12.9
4	34-35	12.9-13.1
5	35-36	13.1-13.3
6	36-37	13.3-13.5
7	37-38	13.5-13.6
8	38-39	13.6-13.8
9	39-40	13.8-14.0
10	40-41	14.0-14.2
11	41-42	14.2-14.3
12	42-43	14.3-14.5

9.2 Anexo II. Barridos (separaciones) de células CHO-DG44

En las **Figuras 17-21** se muestran los perfiles de ciclo celular de las poblaciones celulares separadas a 1500 (3 repeticiones) y 1000 RPM de velocidad centrífuga respectivamente para determinar el rendimiento del sistema de cultivo de células animales sincronizadas. En las **Tablas 12-15** se muestran los flujos empleados para obtener a las poblaciones en las diferentes fases del ciclo celular de células CHO-DG44.

- **Barrido 2 a 1500 RPM**

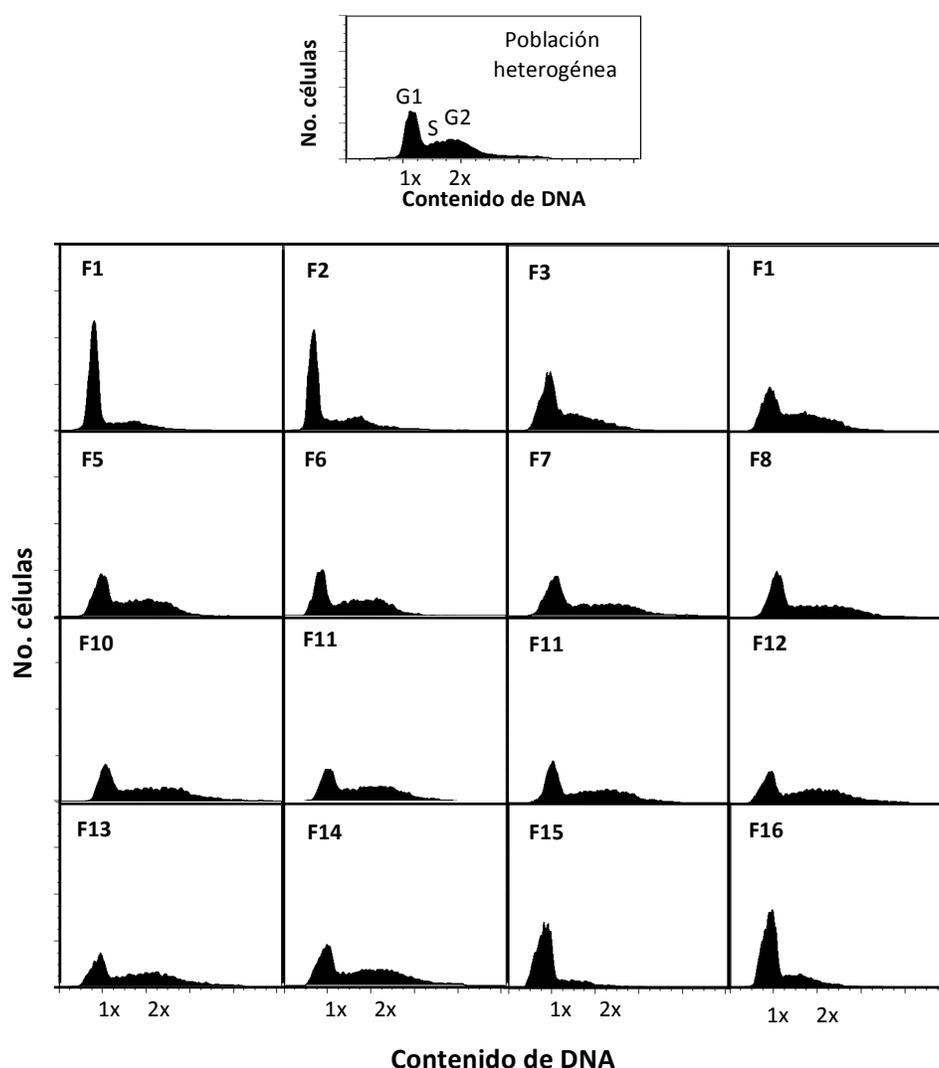


Figura 21. Barrido del contenido de DNA de células CHO-DG44 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1500 RPM. El barrido se realizó con 306×10^6 de células a 28°C .

Tabla 10. Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.

No. Fracción	Flujo (mL min⁻¹)	Diámetro (µm)
1	10-11	9.3-9.8
2	11-13	9.8-10.6
3	13-14	10.6-11.0
4	14-16	11.0-11.8
5	16-18	11.8-12.5
6	18-20	12.5-13.2
7	20-22	13.2-13.8
8	22-24	13.8-14.4
9	24-26	14.4-15.0
10	26-28	15.0-15.6
11	28-30	15.6-16.2
12	30-32	16.2-16.7
13	32-34	16.7-17.2
14	34-36	17.2-17.7
15	36-38	17.7-18.2

- Barrido 3 a 1500 RPM

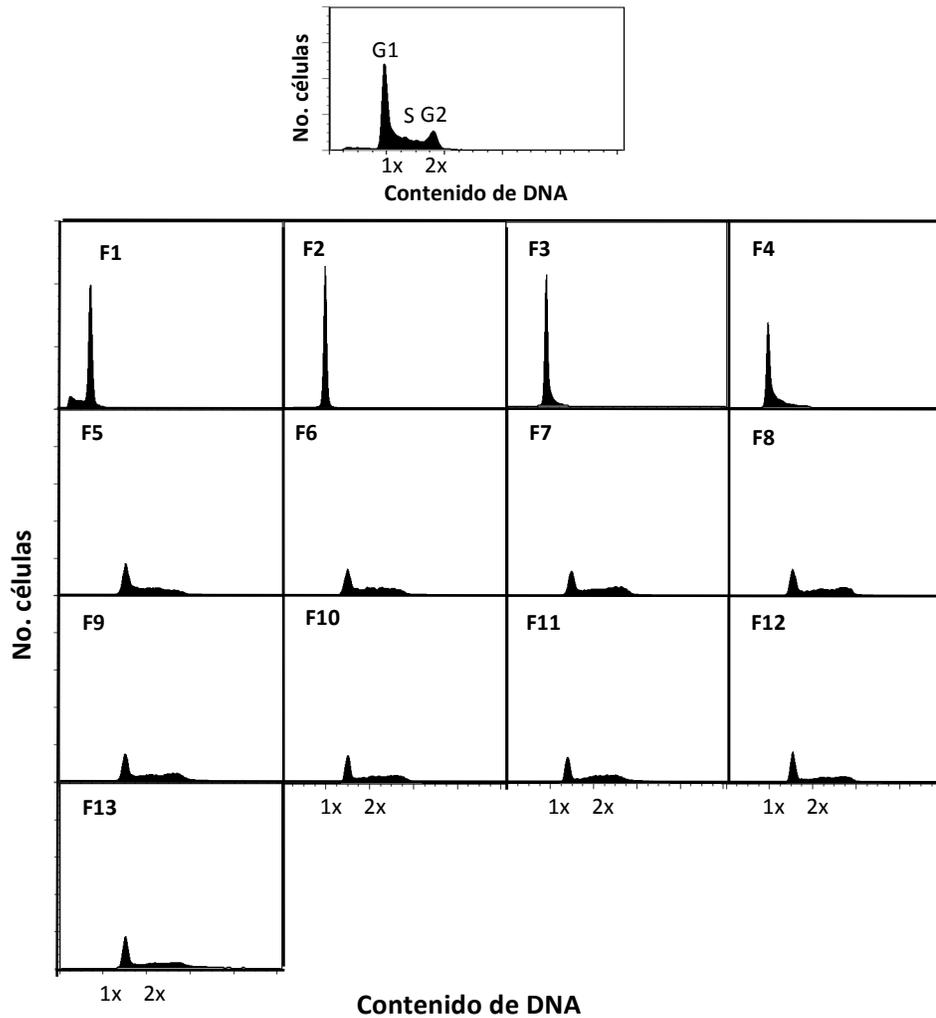


Figura 22. Barrido del contenido de DNA de células CHO-DG44 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1500 RPM. El barrido se realizó con 71×10^6 de células a 28°C .

Tabla 11. Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.

No. Fracción	Flujo (mL min ⁻¹)	Diámetro (µm)
1	13-14	10.6-11.0
2	14-16	11.0-11.8
3	16-18	11.8-12.5
4	18-20	12.5-13.2
5	20-22	13.2-13.8
6	22-24	13.8-14.4
7	24-26	14.4-15.0
8	26-28	15.0-15.6
9	28-30	15.6-16.2
10	30-32	16.2-16.7
11	32-34	16.7-17.2
12	34-36	17.2-17.7
13	36-38	17.7-18.2

- Barrido 4 a 1000 RPM

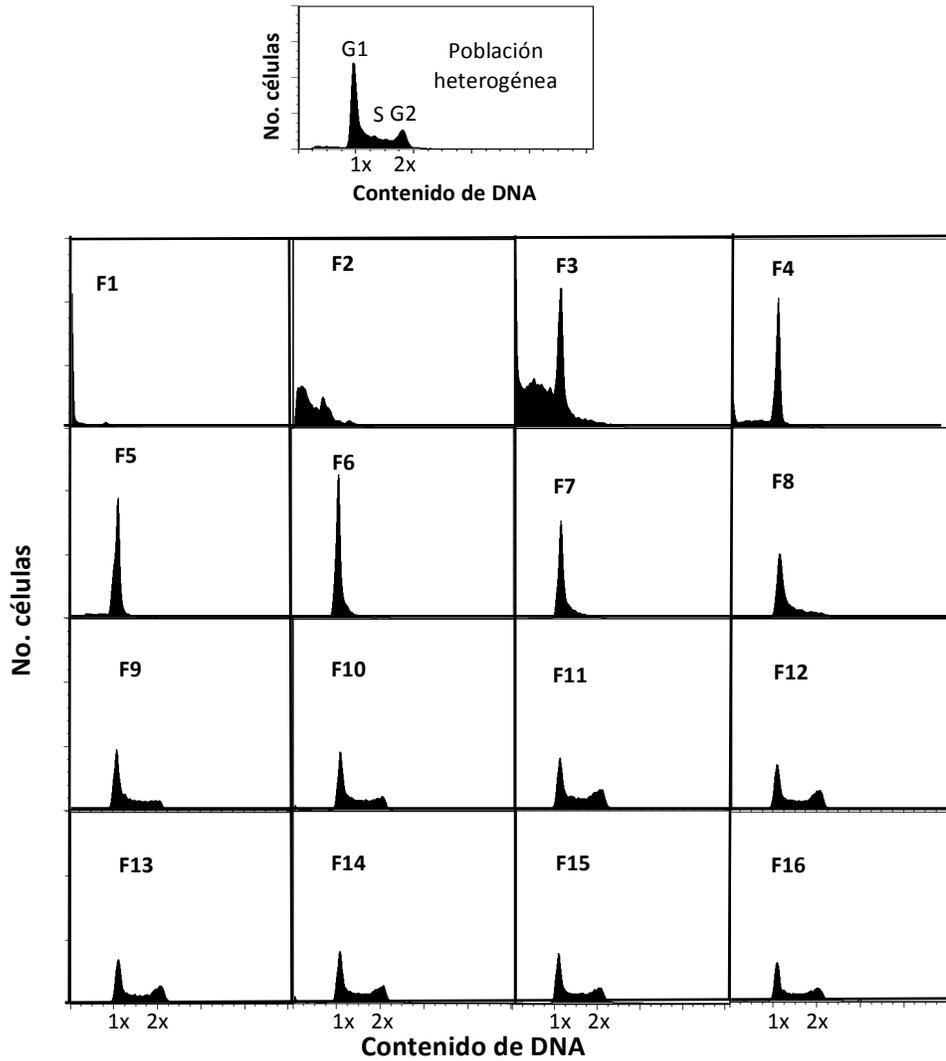


Figura 23. Barrido del contenido de DNA de células CHO-DG44 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1000 RPM. El barrido se realizó con 116×10^6 de células a 28°C .

Tabla 12. Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1000 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.

No. Fracción	Flujo (mL min⁻¹)	Diámetro (μm)
1	5-6	9.9-10.8
2	6-7	10.8-11.7
3	7-8	11.7-12.5
4	8-9	12.5-13.3
5	9-10	13.3-14.0
6	10-11	14.0-14.7
7	11-12	14.7-15.3
8	12-13	15.3-16.0
9	13-14	16.0-16.6
10	14-15	16.6-17.1
11	15-16	17.1-17.7
12	16-17	17.7-18.2
13	17-18	18.2-18.8
14	18-19	18.8-19.3
15	19-20	19.3-19.8
16	20-21	19.8-20.3

- Barrido 5 a 1500 RPM

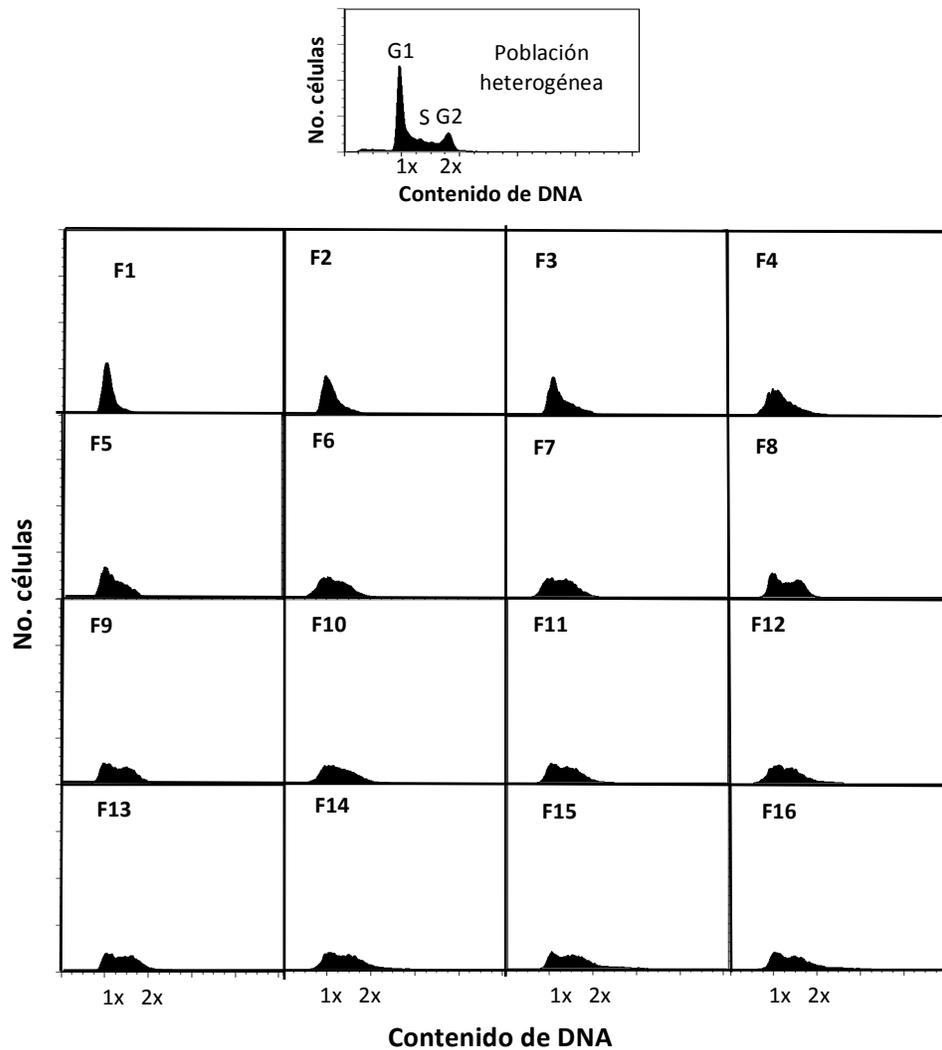


Figura 24. Barrido del contenido de DNA de células CHO-DG44 en las diferentes fases del ciclo celular realizado a 1500 RPM. El barrido se realizó con 546×10^6 de células a 28 °C.

Tabla 13. Diámetros determinados para obtener poblaciones de células CHO-DG44 a 1500 RPM en las diferentes fases del ciclo celular.

No. Fracción	Flujo (mL min⁻¹)	Diámetro (µm)
1	10-11	9.3-9.8
2	11-12	9.8-10.2
3	12-13	10.2-10.6
4	13-14	10.6-11.0
5	14-16	11.0-11.8
6	16-18	11.8-12.5
7	18-20	12.5-13.2
8	20-22	13.2-13.8
9	22-24	13.8-14.4
10	24-26	14.4-15.0
11	26-28	15.0-15.6
12	28-30	15.6-16.2
13	30-32	16.2-16.7
14	32-34	16.7-17.2
15	34-36	17.2-17.7
16	36-38	17.7-18.2

10. Referencias Bibliográficas

- Alberts B., Jonhson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2008) The Cell Cycle. In: Molecular Biology of the Cell 5th Edition. Anderson M. and Granum S. Eds., Garland Science. USA. pp. 1053-1114.
- Al-Rubeai M. y Emery A. (1990) Mechanisms and kinetics of monoclonal antibody synthesis and secretion in synchronous and asynchronous hybridoma cell cultures. *Journal of Biotechnology* 1-2:67- 86.
- Bachère E., Chagot D. y Grizel H. (1988) Cell Separation by Centrifugal Elutriation. *American Fisheries Society Special Publication* 18:281-285.
- Banfalvi G. (2008) Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nature Protocols* 3:663–73.
- Banfalvi G. (2011) Overview of Cell Synchronization. In: *Methods in Molecular Biology* No.761. Cell Cycle Synchronization: Methods and Protocols. Banfalvi G. Ed. Humana Press. USA. pp. 1-23.
- Barrios A. (2014) Caracterización cinética del crecimiento y metabolismo de células animales en cultivos sincronizados en minibiorreactores. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- Bauer J. (1999) Advances in cell separation: recent developments in counterflow centrifugal elutriation and continuous flow cell separation. *Journal of Chromatography B* 722:55-69.
- Bi J., Shuttleworth J. y Al-Rubeai M (2004) Uncoupling of cell growth and proliferation results in enhancement of productivity in p21CIP1-arrested CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering* 85:741-749.

- Cooper S. (2002) Reappraisal of G1-phase arrest and synchronization by lovastatin. *Cell Biology International* 26:715-727.
- Cooper S. (2003) Rethinking synchronization of mammalian cells for cells cycle analysis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60:1099-1106.
- Cooper S. and Shedden K. (2003) Microarray analysis of gene expression during the cell cycle. *Cell Chromosome* 2:1-12.
- Dinnis D., Stansfield S., Schlatter S., Smales C., Alete D., Birch J., Racher A., Marshall C., Nielsen L. y James D. (2006). Functional Proteomic Analysis of GS-NS0 Murine Myeloma Cell Lines With Varying Recombinant Monoclonal Antibody Production Rate. *Biotechnology Bioengineering*. 94:830-41.
- Dorin, M. (1994). Developing Elutriation Protocols. Technical Information. T-1785A Beckman Instruments, Inc.
- Du Z., Treiber D., McCarter J., Yadlin D., Saleem R., McCoy R., Zhang Y., Tharmalingam T., Leith M., Follstad B., Dell B., Grisim B., Zupke C., Heath C., Morris A. y Reddy P. (2014) Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. Jul 9. doi: [10.1002/bit.25332].
- Dutton R.L., Scharer J. and Moo-Young M. (2006) Cell cycle phase dependent productivity of a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology*. 52:55-69.
- Eibl R. y Eibl D. (2014). Disposable Bioreactors for Inoculum Production and Protein Expression. In *Animal Cell Biotechnology. Methods and Protocols*, Pörtner R. ed. Humana Press. USA. Pp 322-335.

- Feder J., Assaraf Y., Seamer L. y Schimke R. (1989). The Pattern of Dihydrofolate Reductase Expression through the Cell Cycle in Rodent and Human Cultured Cells. *The Journal of biological chemistry*. 264:20583-20590.
- Fenge Ch. y Lüllau E. (2006) Cell Culture Biorreactors. In *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*, Ozturk S and Hu WS eds . Taylor and Francis. USA. pp 155-158.
- Figueroa B., Ailor E., Osborne D., Hardwick J., Reff M. y Betenbaugh M. (2007) Enhanced cell culture performance using inducible anti- apoptotic genes E1B-19K and Aven in the production of a monoclonal antibody with Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering* 97: 877-892.
- Freshney R.I. (2005) *Biology of Cultured Cells*. In: *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Techniques* 5th Edition. Wiley-Liss. USA. pp.34-36.
- Furst, A. (1995) *Synchronizing Cultured Cells by Centrifugal Elutriation*. Technical Information. A-1814A. Beckman Instruments, Inc.
- Fussenegger M., Mazur X. y Bailey J. (1997) A novel cytostatic process enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering* 55: 927-939.
- Fussenegger M., Schlatter S., Datwyler D., Mazur X. y Bailey J (1998) Controlled proliferation by multigene metabolic engineering enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Nature Biotechnology* 16: 468-472.
- Grosse J., Meier K., Bauer T., Eilles Ch. y Grimm D. (2012) Cell separation by countercurrent centrifugal elutriation: recent developments. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 42:217-233.

- Holmes P. y Al-Rubeai M. (2000) Cell cycle Synchronization. In: Encyclopedia of cell technology Vol. 1, Spier R.E. Ed. New York, USA. John Wiley & Sons. pp. 342-351.
- Hossler P. (2012) Protein glycosylation control in mammalian cell culture: past, precedents and contemporary prospects. In *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 127:187-219.
- Kauffman M., Noga S., Kelly T. y Donnenberg A. (1990) Isolation of cell cycle fractions by counterflow centrifugal elutriation. *Analytical Biochemistry*. 191, 41-46.
- Keyomarsi K., Sandoval L., Band V. y Pardee A.B. (1991) Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Research*. 51:3602–3609.
- Kromenaker S. y Srienc F. (1991) Cell-cycle-dependent protein accumulation by producer and nonproducer murine hybridoma cell lines: a population analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 38:665-77.
- Kumar N., Gammell P. y Clynes M. (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology*. 53:33-46
- Lara A., Galindo E., Ramírez O. T. y Palomares L. (2006) Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells. *Molecular Biotechnology*. 34:355-381.
- Lindahl P. (1948) Principle of a counter-streaming centrifuge for the separation of particles of different sizes. *Nature* 161: 648.
- Lindahl P. (1956) On counter streaming centrifugation in the separation of cells and cell fragments. *Biochimica et biophysica acta* 21: 411-415.

- Lloyd D. y Al-Rubeai M. (1999) Cell cycle. In: Encyclopedia of bioprocess technology. Spier R.E. Ed. New York, USA. John Wiley & Sons. pp. 465-559.
- Lloyd D., Holmes P., Jackson L., Emery A. y Al-Rubeai M. (2000) Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. *Cytotechnology* 34:59-70.
- Ormerod M. (2000) Analysis of DNA General methods. In: *Flow Cytometry, A Practical Approach* 3th Edition. Oxford University Press Inc. New York ,NY. USA, pp. 83-96.
- Ozturk S. (2006) Cell culture technology-an Overview. In *cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies*, Ozturk S. and Hu W.S. Eds. Taylor and Francis. USA. pp. 1-13.
- Ozturk S. (2014). Equipment for Large- Scale Mammalian Cell Culture. In *Mammalian Cell Culture for Biologics Manufacturing*, Weichang Z. and Kantardiieff A. eds. Springer. USA. pp 69-82.
- Rosas R. (2013) La elutriación centrífuga como un método de sincronización de hibridomas murinos BCF2 en las diferentes fases del ciclo celular. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- Sanderson R., Shepperdson R., Vatter A. y Talmage D. (1977) Isolation and enumerations of peripheral blood monocytes. *Journal of Immunology* 118:1409-14.
- Sanderson R. y Bird K. (1977) Cell Separation by Counterflow Centrifugation. *Methods in Cell Biology*. 15, Chapter 1, pp.1-14.

- Sunley K. y Butler M. (2010) Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnology Advances* 28:385-394.
- Serrato J.A., Hernández V., Estrada-Mondaca S., Palomares L. y 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. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 47:113-124.
- Urbani L., Sherwood S. y Schimke R. (1995) Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle. progression by drugs employed in cell synchronization. *Experimental Cell Research*. 219:159-168.
- Whal A. y Donaldson K. (2001) Centrifugal elutriation to obtain synchronous populations of cellsab. In *Current Protocols in Cell Biology* J. Wiley and Sons, Inc . pp 8.5.1-8.5.16.
- Zamudio F., Saavedra R., Martin B.M., Gurrola-Briones G., Hérion P. y Possani L.D. (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *European Journal of Biochemistry* 204:281-292.