



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Caracterización cinética del crecimiento y metabolismo
de Células animales en cultivos sincronizados en
minibiorreactores”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ABRAHAM NOÉ BARRIOS BAUTISTA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**
VOCAL: **Profesor: OSCAR HERNANDEZ MELENDEZ**
SECRETARIO: **Profesor: JOSE ANTONIO SERRATO PEREZ**
1er. SUPLENTE: **Profesor: CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO**
2do. SUPLENTE: **Profesor: LUIS FRANCISCO FLORES ORTIZ**

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)
"Ismael Cosío Villegas".

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Antonio Serrato Pérez

Sustentante:

Abraham Noé Barrios Bautista

Índice general

| | |
|--|-----|
| 1. Índice de figuras..... | VII |
| 2. Índice de Tablas..... | III |
| 3. Abreviaturas..... | X |
| 4. Resumen: | 1 |
| 5. Introducción: | 2 |
| 6. Antecedentes..... | 3 |
| 6.1 Ciclo celular en Eucariotas | 3 |
| 6.2 Ingeniería en los cultivos celulares. | 5 |
| 6.2.1. Efecto de las condiciones medioambientales en el desempeño del cultivo celular. | 5 |
| 6.3 Sincronización celular..... | 6 |
| 6.3.1. Métodos Químicos de Arresto Celular..... | 7 |
| 6.3.2. Métodos Físicos de Separación Celular..... | 8 |
| 6.4 Elutriación Centrífuga a contracorriente como procedimiento de sincronización celular. | 9 |
| 6.4.1 Principio de operación..... | 9 |
| 6.4.2 Deducción de la ecuación simplificada de la ley de Stokes..... | 9 |
| 7 Justificación | 13 |
| 8 Objetivos..... | 14 |
| 9 Hipótesis | 14 |
| 10. Materiales y Métodos | 15 |
| 10.1 Modelos Biológicos..... | 15 |
| 10.2 Medios de Cultivo..... | 15 |
| 10.2.1 Medio Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) Gibco..... | 15 |
| 10.2.2 Chemically Defined Hybridoma Medium (CD Hybridoma) Gibco..... | 15 |
| 10.2.3 Cellvento CHO-100 Merck..... | 15 |
| 10.2.4 Chemically Defined Medium OptiCHO Gibco..... | 16 |
| 10.3 Mantenimiento celular | 16 |
| 10.3.1 Congelación CHO DG44 e Hibridoma Murino BCF2. | 16 |
| 10.3.2 Descongelación..... | 17 |
| 10.4 Cultivos celulares | 17 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 10.4.1 | <i>Cultivos en Frascos T</i> | 17 |
| 10.4.2 | <i>Cultivos en Minibiorreactor Applikon</i> | 18 |
| 10.4.2.1 | Adecuación y adaptación de puertos de adición y adquisición de muestra, electrodos, mangueras y filtros..... | 18 |
| 10.4.2.2 | Software my-Control y BioXpert V.2 (Applikon) | 18 |
| 10.4.2.3 | Calibración del electrodo pH | 19 |
| 10.4.2.4 | Lavado y esterilización del miniBiorreactor..... | 19 |
| 10.4.2.5 | Calibración del electrodo de Oxígeno Disuelto (OD). | 19 |
| 10.4.2.6 | Preparación del inóculo..... | 20 |
| 10.4.2.7 | Muestreo en Biorreactor..... | 20 |
| 10.4.2.8 | Control de los parámetros de cultivo..... | 20 |
| 10.5 | Cinéticas de crecimiento celular | 20 |
| 10.5.1 | <i>Determinación del tamaño celular relativo</i> | 21 |
| 10.6 | Sistema de Elutriación Centrífuga a contracorriente JE-6B..... | 21 |
| 10.6.1 | <i>Líneas de inyección y de transporte de fluido</i> | 23 |
| 10.6.2 | <i>Ultracentrífuga, Rotor y Cámara de Elutriación</i> | 23 |
| 10.6.3 | <i>Curva de calibración Bomba Peristáltica MiniPuls 3 Gilson</i> | 23 |
| 10.6.3.1 | <i>Curva de calibración de la bomba peristáltica a 1500 rpm de velocidad del rotor de elutriación.</i> | 24 |
| 10.6.4 | <i>Procedimiento general de Elutriación Centrífuga</i> | 24 |
| 10.6.4.1 | <i>Inyección de células no sincronizadas al sistema de elutriación</i> | 25 |
| 10.7 | Obtención del Barrido de ciclo celular | 26 |
| 10.8 | Arresto químico de CHO DG44 con DMSO..... | 26 |
| 10.9 | Consideraciones matemáticas..... | 27 |
| 10.9.1 | <i>Determinación de Flujos para colecta de fracciones de interés.</i> | 27 |
| 10.9.2 | <i>Velocidad específica de crecimiento (μ)</i> | 27 |
| 10.9.3 | <i>Velocidad específica de consumo y producción de metabolitos (q)</i> | 27 |
| 10.10 | Determinaciones analíticas. | 28 |
| 10.10.1 | <i>Concentración y viabilidad celular.</i> | 28 |
| 10.10.2 | <i>Cuantificación y concentración de glucosa, lactato y glutamina.</i> | 29 |
| 10.10.3 | <i>Determinación del contenido de DNA por citometría de flujo.</i> | 29 |
| 10.10.3.1 | <i>Fijación celular</i> | 29 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 10.10.3.2 | <i>Tinción de DNA</i> | 30 |
| 10.10.3.3 | <i>Lectura en citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson)</i> | 30 |
| 10.11 | Análisis estadístico de datos | 30 |
| 10.12 | Reactivos..... | 31 |
| 10.12.1 | <i>PBS 10x</i> | 31 |
| 10.12.2 | <i>Azul de Tripano</i> | 31 |
| 10.12.3 | <i>L-Glutamina 200 mM</i> | 32 |
| 10.12.4 | <i>Ioduro de Propidio 1 mg/mL</i> | 32 |
| 10.12.5 | <i>RNAasa 10 mg/mL</i> | 32 |
| 11. | Resultados y Discusiones | 33 |
| 11.1 | Caracterización del crecimiento celular de CHO DG44 e hibridoma murino BCF2. | 33 |
| 11.1.1 | Caracterización cinética del crecimiento y metabolismo de CHO DG44. | 33 |
| 11.1.1.1 | <i>Perfil cinético del consumo y producción de metabolitos de células CHO DG44 en frascos T-75</i> | 37 |
| 11.1.2 | Caracterización cinética del crecimiento de hibridoma murino BCF2. | 38 |
| 11.2 | Separación y Caracterización de Poblaciones de Hibridoma Murino BCF2 y CHO DG44 de acuerdo a su contenido de DNA en las diferentes fases del ciclo celular mediante Elutriación Centrífuga a contracorriente. | 41 |
| 11.2.1 | <i>Determinación del diámetro celular</i> | 41 |
| 11.2.2 | <i>Curva de calibración de la bomba peristáltica</i> | 42 |
| 11.2.3 | <i>Cálculo de los flujos de elutriación</i> | 43 |
| 11.2.4 | <i>Barridos de poblaciones celulares separadas con base al tamaño</i> | 44 |
| 11.3 | Cultivo en minibiorreactor de fracciones celulares sincronizadas de hibridoma murino BCF2..... | 50 |
| 11.4 | Prueba de estabilidad y Arresto químico con DMSO de CHO DG44..... | 52 |
| 11.4.1 | <i>Prueba de estabilidad del crecimiento y metabolismo de CHO DG44</i> | 52 |
| 11.4.2 | Arresto celular de CHO DG44 con DMSO | 55 |
| 12 | Conclusiones. | 62 |
| 13 | Perspectivas | 63 |
| 14 | Figuras Anexadas..... | 64 |
| 14.1 | Constantes de velocidad de crecimiento celular CHO DG44..... | 64 |
| 14.2 | Cinéticas de crecimiento celular de CHO DG44 en presencia de DMSO a diferentes concentraciones..... | 65 |

15. Referencias..... 68



1. Índice de figuras.

Fig. 1. Fases del ciclo celular a los que se somete la célula durante la progresión del ciclo celular.

Fig 2. a) Medición típica de contenido de DNA por fluorescencia mediante citometría de flujo de células CHO recombinantes. **b)** fases del ciclo celular de células CHO por fluorescencia mediante citometría de flujo empleando un software de análisis (Multicycle, Phoenix Flow Systems).

Figura 3. Cámara de elutriación Standard.

Figura 4. Elementos del sistema de elutriación y rotor acoplado a ultracentrífuga.

Figura 5. Cinética de crecimiento CHO-DG44 en frascos T25. Medio de cultivo CD OptiCHO.

Figura 6. Cinética de crecimiento CHO-DG44 en frascos T75. Medio de cultivo CD OptiCHO.

Figura 7. Cinética de crecimiento de CHO DG44 en Minibiorreactor Instrumentado Applikon con control de las condiciones de cultivo. Medio Cellvento 100.

Figura 8. Perfil metabólico de células CHO en cultivo estático. Medio de cultivo CD OptiCHO.

Figura 9. Cinética típica de crecimiento de hibridoma murino BCF2 en Minibiorreactor Instrumentado Applikon. Medio CD Hybridoma.

Figura 10. Histograma de distribución de diámetros de Hibridoma murino BCF2 realizada en Coulter Multisizer.

Figura 11. Histograma de distribución de diámetros de CHO-DG44 realizada en Coulter Multisizer.

Figura 12: Contenido de DNA de poblaciones celulares de hibridoma murino BCF2 obtenidas por EC.

Figura 13: Contenido de DNA de poblaciones celulares de CHO DG44 obtenidas por EC.

Figura 14: Contenido de DNA de subpoblaciones celulares en fase G₁ del ciclo celular de células CHO-DG44 e hibridoma murino BCF2.

Figura 15. Concentración celular viable y viabilidad de las cinéticas de crecimiento de dos poblaciones sincronizadas de hibridoma murino BCF2 obtenidas por EC.

Figura 16. Perfil de metabolitos de las Cinéticas de crecimiento de dos poblaciones sincronizadas de hibridoma murino BCF2 obtenidas por EC.

Figura 17. Prueba de estabilidad de la línea celular CHO DG44 durante 25 pases en medio de cultivo Cellvento 100.

Figura 18. Perfil de metabolitos durante 25 pases consecutivos.

Figura 19. Arresto químico de células CHO DG44 a diferentes concentraciones (v/v) de DMSO.

Figura 20. Perfil metabólico de CHO a diferentes concentraciones de DMSO v/v.

Figura 21. Velocidad específica de consumo de Glc y Gln, y producción de Lac de CHO DG44 en presencia de diferentes concentraciones de DMSO.

Figuras Anexas

Figura A 1. Regresión lineal primera cinética CHO DG44 en frasco T.

Figura A 2. Regresión lineal segunda cinética CHO DG44 en frasco T.

Figura A 3. Regresión lineal primer cinética CHO DG44 en minibiorreactor.

Figura A 4. Regresión lineal segunda cinética CHO DG44 en minibiorreactor.

Figura A 5. Regresión lineal tercera cinética CHO DG44 en minibiorreactor.

Figura A 6. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 0.0% v/v.

Figura A 7. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 0.5% v/v.

Figura A 8. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 1.0% v/v.

Figura A 9. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 1.5% v/v.

Figura A 10. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 2.0% v/v.

Figura A 11. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 2.5% v/v.

Figura A 12. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 5.0% v/v.

2. Índice de Tablas

Tabla 1. Flujos obtenidos en la curva de calibración de la bomba peristáltica acoplada a la ultracentrífuga a 1500 rpm de velocidad de centrifugación del rotor de elutriación.

Tabla 2. Flujos de separación teóricos para hibridoma murino BCF2 obtenidos por la Ley de Stokes simplificada.

Tabla 3. Flujos de separación teóricos para CHO DG44 obtenidos por la Ley de Stokes simplificada.

Tabla 4. Contenido de DNA de poblaciones heterogénea y sincronizada de células CHO DG44 e hibridoma murino BCF2.

Tabla 5. Comparación de las velocidades específicas de crecimiento para CHO DG44.

Tabla 6. Velocidad específica de consumo de Glc y Gln, y producción de Lac de CHO DG44 en presencia de diferentes concentraciones de DMSO.

3. Abreviaturas

| | | | |
|-------------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| AcM | Anticuerpo Monoclonal | Na₂HPO₄ | Fosfato de sodio dibásico |
| ATCC | Colección Americana de Tipos de Cultivo | NaCl | Cloruro de sodio |
| CDK's | Cinasas dependientes de ciclinas | PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| CKI's | Inhibidores de CDK's | r | radio |
| CHO | Células de Ovario de Hamster Chino | Rpm | Revoluciones por minuto |
| CO₂ | Dioxido de Carbono | s | Segundo |
| DI | Diametro Interno | SFB | Suero Fetal Bovino |
| DMEM | Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco | t | tiempo |
| DMSO | Dimetil Sulfóxido | V | Velocidad de Fluido |
| EC | Elutriación Centrífuga | Vs | Velocidad de sedimentación |
| F | Flujo | Xt | Células totales |
| FACS | Clasificación de células activadas por fluorescencia | %Xv | Porcentaje de viabilidad |
| Fc | Fracción cristalizable | Xv | Células viables |
| Glc | Glucosa | X₀ | Concentración inicial de células viables |
| Gln | Glutamina | η | Viscosidad del fluido |
| KH₂PO₄ | Dihidrogen fosfato de potasio | μ | Velocidad específica de crecimiento |
| Lac | Lactato | μm | Micra |
| Ln | Logaritmo natural | ρm | Densidad del fluido |
| mL | Mililitro | pp | Densidad de la partícula |
| mM | Milimolar | ω | Velocidad angular |

4. Resumen:

En el presente trabajo se estudió el comportamiento cinético y metabólico de dos poblaciones celulares del hibridoma murino BCF2 sincronizadas en la fase G₁ del ciclo celular obtenidas por Elutriación Centrífuga (EC). El sistema de EC montado permitió obtener de manera estéril a células con alta pureza y viabilidad en la fase G₁ del ciclo celular para ser cultivadas nuevamente. El perfil de distribución de tamaño de las subpoblaciones de hibridoma murino BCF2 empleadas comprendió tamaños desde las 12 a las 18 micras. Las poblaciones celulares sincronizadas de hibridoma murino BCF2 mostraron un perfil de crecimiento escalonado durante 48 horas con una constante de la velocidad de crecimiento promedio de 0.0176 h⁻¹ para el primer ciclo de duplicación, es decir, 2.3 veces menor que la mostrada por un cultivo tradicional de células no sincronizadas (0.0401 h⁻¹). Se determinó que los perfiles de consumo de glucosa y glutamina, a diferencia del perfil de producción de lactato, son semejantes a los observados en cultivos no sincronizados.

Se evaluó, además, el comportamiento cinético de la línea celular CHO DG44 (Células de Ovario de Hámster Chino) en medios de cultivo químicamente definido (Cellvento 100 y CD OptiCHO). Se determinó el impacto del DMSO (Dimetil Sulfoxido) a diferentes concentraciones en el perfil de crecimiento de CHO DG44. Se realizó la proliferación ininterrumpida de la línea celular CHO DG44 durante 25 pases (poco más de tres meses) con la finalidad de determinar su estabilidad en cultivo. En todos los cultivos celulares se determinó el perfil de consumo de Glucosa (Glc) y Glutamina (Gln) y de producción de Lactato (Lac). Se determinó que la línea celular CHO DG44 es estable durante un cultivo ininterrumpido de poco más de 3 meses. Se estableció la concentración de DMSO 1.5% (v/v) como la concentración óptima para generar el arresto celular sin afectaciones considerables en la viabilidad y el metabolismo en cultivo. Se observó que a una concentración 2.5% de DMSO incrementó el metabolismo de las células CHO DG44.

5. Introducción:

Con las patentes próximas a vencer de las principales proteínas recombinantes de uso terapéutico se abre la posibilidad en México de producirlas como biocomparables con los mismos estándares de calidad y a mejor precio. La producción de dichas moléculas empleando células de mamífero requiere de medios de cultivo complejos y del control riguroso de las condiciones ambientales como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la fuerza iónica.

Debido al aumento en la demanda de proteínas terapéuticas recombinantes, particularmente anticuerpos monoclonales, el desarrollo de líneas estables y altamente productoras se ha convertido en el nuevo desafío para la industria biofarmacéutica (Chusainow et al., 2009), por lo que el comportamiento cinético y la forma de expresión, secreción y glicosilación de proteínas (asociadas a las condiciones ambientales a las que son sometidas las células) son aspectos considerados al momento de diseñar y desarrollar bioprocesos (Lloyd and Al-Rubeai, 2002; Kumar et al., 2007).

Los hibridomas y las células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) han sido empleadas desde la segunda mitad del siglo XX como sistema primario de producción de proteínas recombinantes a gran escala por su rápido crecimiento, fácil transfección y por la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales (Kumar et al., 2007). Las líneas celulares empleadas convencionalmente en los procesos de producción de proteínas recombinantes operan bajo un crecimiento heterogéneo (células en diversas fases del ciclo celular) por lo que se ha propuesto a los cultivos de células sincronizadas (poblaciones celulares homogéneas para una fase del ciclo celular) como una estrategia novedosa para poder estudiar la fisiología y el metabolismo en las diferentes fases del ciclo celular (Rosas, 2013), esperando obtener resultados más específicos y representativos que los obtenidos a partir de cultivos celulares no sincronizados (heterogéneos) en donde es evidente la falta de una duplicación sincronizada y un comportamiento cinético observado meramente aparente.

6. Antecedentes

6.1 Ciclo celular en Eucariotas

Durante el proceso de división celular la célula (que dará origen a dos células nuevas e idénticas) experimenta múltiples y muy diversos cambios tanto estructurales como funcionales que son agrupados en las denominadas “fases” del ciclo celular. (Véase Fig. 1).

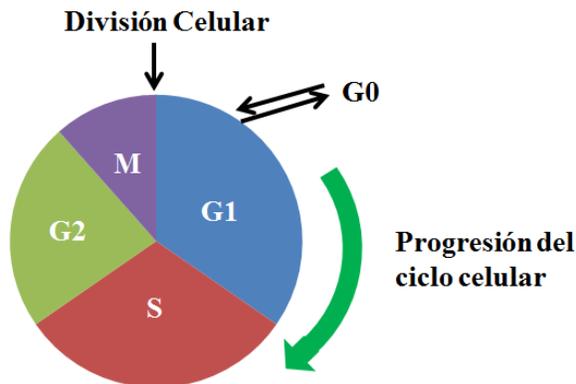


Fig. 1. Fases del ciclo celular a los que se somete la célula durante la progresión del ciclo celular. Tomado y modificado de Lloyd and Al-Rubeai, 2002.

En la fase G_1 (del inglés Gap 1) se preparan para la duplicación celular aumentando el tamaño y la biomasa; en la fase S (del inglés Synthesis) sintetizan suficiente DNA para dotar a dos células con la misma información genética y estructuras subcelulares (células tetraploides, $4n$); en la fase G_2 (del inglés Gap 2) se sintetizan las proteínas necesarias para llevar a cabo la segregación cromosomal y la división celular, para finalmente generar células diploides ($2n$) en la mitosis. Al final del ciclo celular, después de ocurrida la división, las células pueden o no entrar en una etapa en la que permanecen viables pero sin cambios (Fase G_0 , del inglés Gap 0), donde están a la espera de un estímulo exterior para comenzar de nuevo la duplicación celular (Boye et al., 1996; Quon et al., 1996).

Existen células en continua duplicación, llamadas células “establecidas o inmortales”, que son líneas celulares o células transformadas que no necesariamente progresan a G_0 después de un ciclo celular, sino que entran directamente en fase G_1 después de la mitosis previa, tal como ocurre con los

hibridomas, que son líneas celulares obtenidas de la fusión de un linfocito B productor de anticuerpo con un linfocito B de origen canceroso (mieloma) (Winzeler and Wang, 2013).

La actividad celular ocurrida durante la progresión del ciclo hasta la división celular es regulada por enzimas denominadas Ciclinas Dependientes de Cinasas (CDK's) y éstas a su vez son sujetas a estrictos controles que gobiernan su expresión, activación y degradación, dándole a las células la capacidad para responder a diferentes cambios en su entorno (Ishidate T., 2014).

Los cambios en el contenido de DNA ocurridos durante el ciclo celular pueden ser estudiados por técnicas como la cuantificación de la cantidad de DNA por citometría de flujo, índice mitótico (proporción de células en cualquier fase de la mitosis dentro de la población celular analizada) o por marcaje de nucleótidos en fase S empleando anticuerpos monoclonales acoplados a deoxiuridinas halogenadas que se intercalan en el DNA (Aten et al., 1992). Para los fines del presente estudio se midió por citometría de flujo con Yoduro de Propidio, obteniendo perfiles de contenido de DNA (Véase Fig. 2a) con los que es posible determinar tanto la fase del ciclo celular en la que se encuentra una población de células como su contenido de DNA relativo, medido y expresado en valores porcentuales de acuerdo a modelos computacionales aplicados por el software empleado (Véase Fig. 2b).

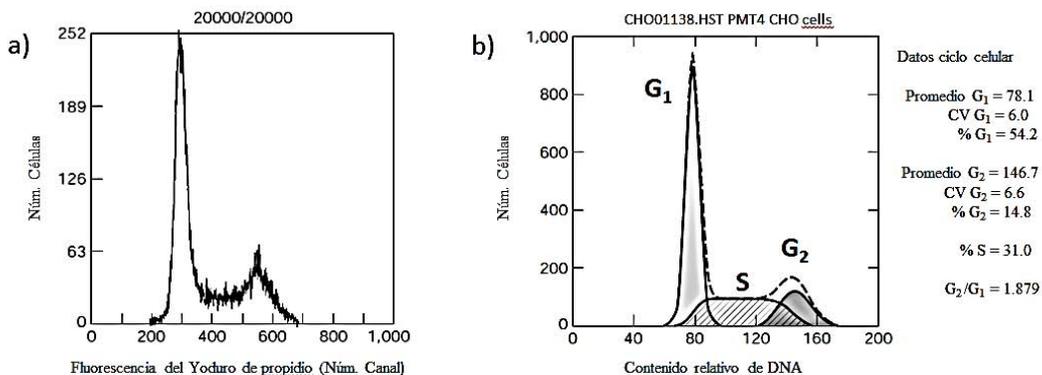


Fig 2. a) Medición típica de contenido de DNA por fluorescencia mediante citometría de flujo de células CHO recombinantes. **b)** fases del ciclo celular de células CHO por

fluorescencia mediante citometría de flujo empleando un software de análisis (Multicycle, Phoenix Flow Systems). Tomado y modificado de Lloyd and Al-Rubeai, (2002).

6.2 Ingeniería en los cultivos celulares.

La ingeniería aplicada a los cultivos de líneas celulares ha permitido la manipulación y el control de algunas líneas celulares con la finalidad de aumentar o mejorar algún proceso biológico (Ingeniería genética), como ocurre con la inserción del gen exógeno DHFR (Dehidrofolato Reductasa) con el objetivo de presionar sistemas biológicos con Metotrexato para aumentar la producción de proteínas recombinantes (Duttom and Scharer, 2007). La Ingeniería en los Bioprocesos se ha ocupado de la aplicación tecnológica de los sistemas en organismos vivos para la obtención de productos biológicos para un uso específico, como el diseño y la implementación de biorreactores con los que se pueden monitorear las condiciones ambientales reales de un cultivo en progreso.

6.2.1. Efecto de las condiciones medioambientales en el desempeño del cultivo celular.

Los minibioreactores han posibilitado el estudio y la optimización de la productividad de los cultivos en virtud de que generan resultados escalables y a que permite un manejo de grandes volúmenes de cultivo con la consecuente generación de un mayor número de células. Debido a lo anterior, las particularidades observadas en los cultivos pueden ser el reflejo directo de las condiciones ambientales presentes durante el cultivo.

Una proliferación celular por debajo de la esperada puede ser causada por una falta de nutrientes, acumulación de metabolitos tóxicos en el medio o por desviaciones de las condiciones óptimas del cultivo. Se ha observado que la temperatura juega un rol importante en los cultivos ya que por debajo de la temperatura óptima se incrementa la duración del ciclo celular y se disminuyen los índices de crecimiento, pero a temperaturas por encima de la óptima se producen

proteínas de choque térmico que causan la muerte de las células (Li and Srivastava, 2004).

Por otro lado, la falta de precursores químicos y de factores de crecimiento generan un retraso en la síntesis de DNA. Se ha observado que la falta de factores de crecimiento como FGF (factor de crecimiento de fibroblasto), PDGF (factor de crecimiento epidermal derivado de plaquetas) e IGF I y II (factor de crecimiento parecido a la insulina I y II) afecta la producción de citocinas y ciclinas (CDK's) necesarias para la señalización celular (Darzynkiewicz et al., 1996).

Dado lo anterior, algunas estrategias para mejorar la proliferación celular han sido típicamente implementadas en la fase de crecimiento exponencial, mostrando además una mejora en la productividad y durabilidad de los cultivos (Kumar et al., 2007). Es importante considerar que la expresión de productos dependientes del ciclo celular puede variar con el tipo de línea celular empleada, el vector de expresión usado, la naturaleza del gen recombinante o por el promotor necesario para la expresión del gen, además de los efectos de la regulación post-transcripcional y de las condiciones químicas o físicas del medio de cultivo (Lloyd et al., 1999; Lloyd and Al-Rubeai, 2002).

6.3 Sincronización celular

Cooper, (2003) define a un cultivo sincronizado como un conjunto de células que pasan por la división celular de manera uniforme durante el tiempo de cultivo, si las células siguen este patrón como grupo, podrán entonces llamarse sincronizadas. Aclara que un cultivo no necesariamente debe tener una sincronía perfecta para ser sincronizado ya que existe una variación estocástica en los tiempos interdivisionales y enumera, también, tres criterios para una sincronización exitosa: 1) el contenido de DNA deberá ser uniforme en la población inicial, 2) la distribución de tamaño de la población sincronizada deberá ser más angosta que la población no sincronizada y finalmente, y más importante, 3) el cultivo sincronizado debería exhibir divisiones celulares sincronizadas.

El principal interés por obtener poblaciones celulares sincronizadas radica en la necesidad de estudiar aspectos bioquímicos y morfológicos propios de cada fase del ciclo que permitan un mayor entendimiento de éstas (Al-Rubeai et al., 1991; Kromenaker and Sriene, 1991; Matherly et al., 1989) y, en nuestro caso, la optimización de los procesos de producción de proteínas recombinantes en cultivo (Rosas, 2013)

La subpoblación G₁ ha sido propuesta como la subpoblación ideal para realizar estudios donde se busque incrementar la producción de proteína recombinante de líneas celulares como hibridomas y células CHO (Kumar et al., 2007). Lo anterior se fundamenta en las evidencias que muestran que las células arrestadas al final de la fase G₁ son más activas metabólicamente y de mayor tamaño que las células no arrestadas (Carvalho et al., 2003; Bi et al., 2004); también a que los procesos de excreción proteica se llevan a cabo durante la fase G₁ o S del ciclo celular, iniciando y siendo mayor en G₁ y, particularmente, que la producción específica de proteína aumenta cuando el ciclo celular es arrestado y las células se mantienen en G₁ (Lloyd and Al-Rubeai, 2002).

Algunos procedimientos para obtener poblaciones sincronizadas involucran el uso de agentes químicos de arresto celular o la sincronización física de células a partir de similitudes en la densidad, tamaño y área superficial (Banfalvi, 2008).

6.3.1. Métodos Químicos de Arresto Celular.

Los agentes químicos de arresto han sido propuestos como estrategia para optimizar la producción de proteínas recombinantes en cultivos celulares por el aumento generado en la duración de los cultivos (Kumar et al., 2007). Se han propuesto metodologías de arresto celular como son la disminución de la temperatura de cultivo (28-33°C) con disminución del crecimiento (Trummer et al., 2006), cultivos a altas concentraciones de oxígeno disuelto (Ohsaka et al., 2002), modificar las concentraciones de ciclinas dependientes de cinasas (CDK's) y los inhibidores dependientes de cinasas (CKI's) observando en células CHO un aumento en el metabolismo y en la producción de proteína recombinante (Hayles

et al., 1994; Nurse, 1994; Bi et al., 2004). Finalmente, el empleo de compuestos químicos de arresto celular como hidroxurea, timidina, metotrexato, afidicolina y dimetilsulfóxido (DMSO), con los que se ha observado un arresto parcial del ciclo, sin embargo con algunas consecuencias como alteraciones en el metabolismo y crecimiento de las células (Cowan and Milstein, 1972; Banfalvi, 2008).

En el caso particular del DMSO se ha demostrado que causa un arresto celular efectivo y reversible en G_1 (Fiore et al., 2002), ya que inhibe el crecimiento celular por afectación a la actividad de CDK's y CKI's (Ponzio et al., 1998) y se ha observado que a una concentración de 1.5% en células CHO adherentes aumenta la expresión de $p27^{k1p1}$ y Bcl-2, causando un aumento de la adhesión celular y una disminución de la apoptosis (Fiore et al., 1999).

6.3.2. Métodos Físicos de Separación Celular.

Los métodos físicos de separación (sincronización) celular permiten obtener un alto grado de sincronía celular con las mínimas alteraciones metabólicas y fisiológicas, contrario a lo que ocurre cuando se emplean agentes químicos de arresto (Cooper, 2003; Grosse et al., 2012). Algunas técnicas propuestas son la separación mitótica, la centrifugación por gradiente de densidad, selección-separación mediante citometría de flujo y la EC.

La EC es una técnica que permite separar poblaciones celulares con base en las propiedades de sedimentación de las células (densidad y tamaño) con perturbaciones mínimas a las funciones celulares. El principio físico de la separación por EC se fundamenta matemáticamente en la ley de Stokes y supone que las partículas son esféricas, que el flujo es laminar y que no hay un efecto considerable por las fuerzas de interacción entre las partículas y la gravedad (Banfalvi, 2008)

6.4 Elutriación Centrífuga a contracorriente como procedimiento de sincronización celular.

Desde su desarrollo e implementación como método de separación (Lindhal, 1948), la EC ha sido empleada en la separación de diferentes tipos celulares presentes en tejido sanguíneo (Coulais et al., 2012). Además, se puede emplear para conseguir la separación de diferentes poblaciones del ciclo celular de un mismo linaje (Rosas, 2013).

6.4.1 Principio de operación

Para la EC es necesario contar con una cámara especial de separación de partículas, un generador de fuerza centrífuga (rotor) y de una fuerza de bombeo. El equilibrio de fuerzas que opera dentro de la cámara de elutriación es establecido por las variables de densidad de la partícula (g/mL), tamaño de partícula (μm), densidad del fluido (g/mL) y fuerza centrífuga (rpm) que determinan la velocidad de Sedimentación (m/s), además de la viscosidad del fluido (mPa/s), flujo a contracorriente (mL/min) y velocidad del fluido (m/s). Cuando se encuentran en equilibrio las células dentro de la cámara de separación entre las fuerzas centrífuga y de bombeo, las células ocupan una posición espacial dentro de la cámara de separación de acuerdo a su velocidad de sedimentación y una vez que se aumenta de manera gradual la fuerza de bombeo el equilibrio se rompe y comienzan a salir las partículas con menor velocidad de sedimentación (células en fase G_1 del ciclo celular) hasta que salen las de mayor velocidad de sedimentación (células en fase G_2 del ciclo celular) (Banfalvi, 2008).

6.4.2 Deducción de la ecuación simplificada de la ley de Stokes.

La Ley de Stokes es el principio matemático que modela la separación mediante EC. Define la fuerza de arrastre (F) necesaria para mover una esfera pequeña a través de un fluido continuo a cierta velocidad (V_s) basándose en el radio (r) de la esfera y en la viscosidad del fluido (η) (Rosas, 2013).

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

De la ley de Stokes se deduce la ecuación para el cálculo de la velocidad de sedimentación de una partícula esférica en un campo de fuerza centrífuga.

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

Donde V_s es la velocidad de sedimentación, (r) es la posición radial de la partícula, (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.

La ley de Stokes fue diseñada para partículas esféricas sólidas, sin embargo, se puede usar para células tomando en cuenta las siguientes consideraciones para el sistema.

- Se asume forma esférica
- Se asume que no hay interacción entre células
- Se asume flujo laminar
- Densidad celular y tamaño constante durante el estado de suspensión dentro de la cámara.

De la ecuación 2 se observa que la velocidad de sedimentación es afectada de manera directamente proporcional por el tamaño y la densidad de las células; debido a que las subpoblaciones celulares no varían mucho en el valor de su densidad y a que el diámetro está elevado a la segunda potencia, la separación por EC se lleva a cabo principalmente por las diferencias de tamaño entre subpoblaciones, es decir, que el tamaño define la posición radial de las células dentro de la cámara.

En el procedimiento de EC, la fuerza centrífuga que produce la sedimentación celular (V_s) en una posición radial es equilibrada por el flujo y la velocidad del fluido (V) en sentido contrario.

De modo que se puede incorporar a la ecuación 2 la velocidad de flujo (m/s) que equivale al flujo F (mL/min) dividido entre el área de la sección transversal (A) de la cámara de separación en el punto de estudio.

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

La velocidad del fluido (V) en una tubería es también descrita por $V_1 A_1 = V_2 A_2$ que nos habla del cambio de la velocidad cuando cambia el diámetro de la tubería, esto es importante porque nuestra cámara de separación (Véase figura 3) tiene una forma cónica de modo que cambia el área de la sección transversal.

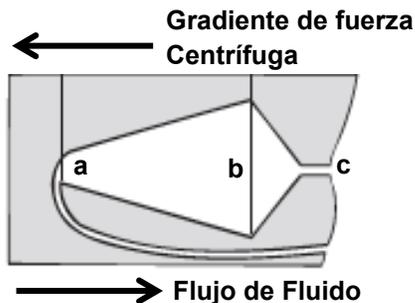


Figura 3. Cámara de elutriación Estándar. Donde a) es la entrada a la cámara, b) la frontera de elutriación y c) la salida de la cámara. Tomada y modificada de: Instruction Manual. The JE-6B Elutriation System and

De esta forma se generan dos tipos de gradientes dentro de la cámara: uno es el gradiente de velocidad del fluido, disminuyendo de la entrada de la cámara hacia la frontera de elutriación (Véase Figura 4), y un gradiente de fuerza centrífuga incrementando de la frontera de elutriación hacia la entrada de la cámara.

De modo que en donde la fuerza centrífuga es menor (frontera de elutriación) la velocidad de flujo (V) es menor y el área de la cámara es mayor y en donde la fuerza centrífuga es mayor (entrada de la cámara) también lo es la velocidad de flujo pero con un área de menor tamaño. Por lo tanto las separaciones son el resultado de diferentes velocidades de sedimentación que están en equilibrio en diferentes posiciones radiales dentro de la cámara.

Cuando la velocidad de flujo se incrementa, las células que se encontraban en equilibrio cerca de la frontera de la cámara de elutriación (de menor tamaño) son expulsadas, mientras que las células que aún están dentro se recorren hacia el centro de rotación siendo la población de mayor tamaño la última en ser expulsada. Si la ecuación (3) se despeja para F obtenemos la ecuación (4).

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

Considerando r como el radio de la frontera de elutriación (86 mm para la cámara de elutriación Estándar), la conversión de la velocidad angular (ω) a rpm, asumiendo que la diferencia entre la densidad de la partícula y la densidad del medio de elutriación ($\rho_p - \rho_m$) = 0.05g/mL y que la viscosidad del medio de elutriación (η) oscila en un valor de 1.002 mPa*s obtenemos una constante adimensional X para nuestro sistema que tiene un valor de 0.0511 para la frontera de elutriación. Como resultado se obtiene la ecuación (5) mediante la cual se puede determinar el flujo (mL/min) necesario para que una población de determinado diámetro (μm) sea expulsada de la cámara de elutriación (Instruction Manual. The JE-6B Elutriation System and Rotor, Beckman Coulter, 2009).

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

7 Justificación

En la actualidad se busca un mayor entendimiento de los cambios que ocurren en las células durante las fases del ciclo celular para poder optimizar bioprocesos por los cuales se obtienen proteínas recombinantes en cultivo. Lo anterior con la intención de generar procesos más productivos y un abaratamiento en los costos de producción en conjunto con una mayor distribución de estos productos para su uso en la investigación y en la práctica médica.

La caracterización de los cultivos de Hibridoma murino BCF2 sincronizados por la técnica de EC permite el estudio detallado de los cambios en el crecimiento y metabolismo ocurridos durante la progresión del ciclo celular en un cultivo homogéneo.

La caracterización de los cultivos de CHO-DG44 en el laboratorio permite la planeación de estrategias de estudio y de optimización de producción de biomoléculas de interés provenientes de dicha línea celular.

8 Objetivos

Objetivo General: Caracterización del crecimiento celular y del metabolismo (consumo/producción de Glucosa, Lactato y Glutamina) de cultivos sincronizados y no sincronizados de células animales.

Objetivos particulares:

- a) Caracterización cinética del crecimiento y del perfil metabólico (Glc, Gln y Lac) de células sincronizadas de hibridoma murino BCF2.
- b) Caracterización cinética del crecimiento y del perfil metabólico celular (Glucosa, Lactato y Glutamina) de un cultivo heterogéneo de células CHO DG44.
- c) Determinación de la estabilidad del crecimiento y perfil metabólico de células CHO DG44 durante una serie de pases heterogéneos consecutivos.
- d) Arresto del ciclo celular de CHO DG44 con diferentes concentraciones de DMSO y caracterización de los efectos en el crecimiento y perfil metabólico de Glc, Gln y Lac.

9 Hipótesis

- El cultivo de una población sincronizada de hibridoma murino BCF2 mostrará una curva de crecimiento escalonado y su perfil metabólico presentara cambios respecto a los observados en un cultivo no sincronizado.
- El comportamiento cinético de las células CHO DG44 se verá modificado al aumentar el número de pases durante una secuencia de cultivos consecutivos.
- La presencia de DMSO en cultivos de células CHO DG44 tendrá un efecto negativo concentración-dependiente en el crecimiento y el metabolismo celular.

10. Materiales y Métodos

10.1 Modelos Biológicos

La línea celular CHO DG44 (ATCC PTA-3356) produce una proteína modelo dirigida a la fracción Fc de los anticuerpos.

El hibridoma murino BCF2 utilizado en éste proyecto se derivó de una línea de ratones Balb/c. El AcM que produce dicho hibridoma es de clase G (IgG2a), neutralizante y específico contra la toxina 2 del veneno del alacrán Centuroides noxius Hoffmann. Éste AcM inhibe la unión de la toxina con las membranas sinaptosomales del cerebro de ratón, mostrando así una actividad neutralizante *in vivo* (Zamudio et al., 1992). La línea celular fue proporcionada por el Dr. Lourival Possani del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M.

10.2 Medios de Cultivo

10.2.1 Medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Gibco.

El medio DMEM sin suero fetal bovino (SFB), fue usado como medio de elutriación para realizar la separación de las poblaciones celulares en la fase G1 del ciclo celular mediante EC, con la finalidad de causar menos estrés a las células durante el procedimiento.

10.2.2 Chemically Defined Hybridoma Medium (CD Hybridoma) Gibco.

El medio CD Hybridoma, fue usado como medio de cultivo para la línea celular BCF2. Dicho medio es recomendado por Gibco para hibridomas murinos productores de anticuerpos monoclonales. Fue suplementado con 6 mM de L-Glutamina para su uso.

10.2.3 Cellvento CHO-100 Merck.

El medio químicamente definido, Cellvento, fue utilizado como medio de cultivo para CHO DG44. Cabe mencionar que, a pesar de que dicho medio fue diseñado específicamente para el crecimiento de células CHO-S, es un medio adecuado

para el crecimiento de líneas celulares CHO comúnmente empleadas para la expresión de anticuerpos monoclonales o de proteínas recombinantes de un cultivo en suspensión. El medio fue suplementado con 6mM de L-Glutamina y 2.0 g/L de Bicarbonato de sodio y fue empleado para el cultivo de la línea celular en los minibiorreactores.

10.2.4 Chemically Defined Medium OptiCHO Gibco.

El medio CD OptiCHO, también fue usado como medio de cultivo para la línea celular CHO DG44 durante las primeras pruebas del presente trabajo. Dicho medio es recomendado por Gibco para células CHO productores de anticuerpos monoclonales. Fue suplementado con 6mM de L-Glutamina para su uso.

10.3 Mantenimiento celular

10.3.1 Congelación CHO DG44 e Híbrido Murino BCF2.

- a) Se realizaron los cálculos necesarios considerando que al final del proceso cada criovial debe contar con una concentración de entre 5 a 10 millones de células viables por mililitro.
- b) Se centrifugó el volumen de cultivo celular en tubos cónicos por 10 minutos a 800 rpm para formar el botón celular.
- c) Se preparó una mezcla de medio fresco suplementado con L-Glutamina a 6mM (45% vol. Total) con Dimetil Sulfoxido (10% vol. Total). Se colocó en hielo debido a lo exotérmico de la reacción.
- d) Posterior a la centrifugación se trasvasó medio sobrenadante (medio acondicionado) en un tubo cónico estéril para su posterior empleo.
- e) Se resuspendió el botón celular en el 45% del volumen final necesario utilizando medio acondicionado.
- f) Se mezclaron los volúmenes de c) y e).
- g) Se dispensó 1 mL por criovial.
- h) Se colocaron crioviales en congelador de -30 °C hasta su congelación.
- i) Se preservaron los crioviales en N₂ líquido.

10.3.2 Descongelación

- a) Se vertieron 4 mL de medio de cultivo fresco y suplementado con L-Glutamina en un tubo cónico de 15 mL.
- b) En un frasco T25 se colocaron 5 mL de medio de cultivo fresco suplementado.
- c) Se descongeló un criovial de células, pasando a 37°C lo más rápido posible.
- d) Se vertió el contenido de un criovial al tubo cónico con 4 mL de medio de cultivo con la finalidad de resuspender y lavar las células.
- e) Se centrifugó la suspensión celular a 800 rpm durante 10 min.
- f) Se eliminó el sobrenadante, teniendo cuidado de no aspirar el pellet celular.
- g) Finalmente se resuspendió el pellet con el volumen contenido en el frasco T25 y se incubó a 37°C, 5 % de CO₂ y humedad a saturación.

10.4 Cultivos celulares

10.4.1 Cultivos en Frascos T

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

Los cultivos para la caracterización cinética de ambas líneas celulares se realizaron por triplicado, iniciando con una concentración celular de 0.2×10^6 cel/mL en frascos de 25 cm² (T25) con 5 mL de medio de cultivo fresco. Las condiciones de incubación fueron 37 °C, humedad a saturación y 5.0% de CO₂.

10.4.2 Cultivos en Minibiorreactor Applikon

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

El biorreactor está constituido por una jarra de 250 o 500 mL de volumen nominal operados a un 70% de su capacidad, asegurando con ello la transferencia de gases hacia el seno del líquido ayudado por el agitador que aumenta la difusión interna de los gases.

Se seleccionaron los puertos por los cuales se operaría el sistema para la entrada y salida de medio de cultivo, toma de muestra, inyección de gases, salida de gases e inyección de NaOH en caso de necesitar aumentar el pH. Se utilizó manguera Tygon impermeable a gases, de diámetro interno de 3.1 mm para las conexiones. Para asegurar la esterilidad del sistema se colocaron filtros Milipore de 0.22 micras en la inyección y salida de gases. Se utilizaron tubos de fondo cónico de 15 mL (Sarstedt) en el puerto de toma de muestra. Se conectó al puerto de entrada y salida de medio de cultivo un frasco de 500 mL para la manipulación del contenido del vaso del Biorreactor, con la finalidad de retirar agua después de la esterilización, la entrada de medio fresco e inóculo y salida de medio agotado con células, operado por cambios hidrodinámicos.

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

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

El software BioXpert V.2 fue instalado para la adquisición y despliegue de datos del proceso de fermentación. Cuenta con un módulo especial de instalación definido por el usuario para el acoplamiento de diferentes fermentadores a la PC. Cuenta con un editor y una biblioteca de ecuaciones para el análisis de los datos

de cultivo en lote, feedbatch y de cultivo continuo. 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.

10.4.2.3 Calibración del electrodo pH

Se calibró el electrodo de pH, conectado a la unidad de control y al software my-Control, utilizando Buffer pH 7 y pH 4 a temperatura conocida, de acuerdo al manual del equipo y del software. La calibración del electrodo de pH se realiza previo a la esterilización por autoclave del biorreactor.

10.4.2.4 Lavado y esterilización del miniBiorreactor.

Se lavó el Biorreactor con una solución de detergente Extran al 5% y se sanitizó con etanol al 70%, asegurándose de enjuagar bien con agua destilada. Se colocaron 200 mL de agua miliQ al vaso una vez limpio con la finalidad de que los electrodos se encuentren inmersos durante la esterilización. Se colocaron los electrodos de pH y DO y se montó el biorreactor a su base. Se esterilizó por autoclave a 121°C, 20 minutos, sin prevacío y a escape lento, dejando abierto el filtro de la salida de gases del reactor y del frasco de 500 mL para evitar que se presurice el reactor y se estrellara la jarra o el electrodo de pH.

10.4.2.5 Calibración del electrodo de Oxígeno Disuelto (OD).

Después de esterilizar el biorreactor y previo a la calibración del electrodo de OD, se dejó enfriar el reactor hasta alcanzar la temperatura de trabajo (37°C) y se polarizó el electrodo conectándolo a la unidad de control central (CPU) durante un mínimo 4 horas. La calibración se realizó a dos puntos: 1) a saturación con aire mediante burbujeo de aire (estéril) y a 37°C, lo cual es equivalente a una presión parcial de O₂ de 0.21%, interpretado por el sistema como 100% de OD; 2) a saturación con nitrógeno mediante el burbujeo de N₂ (estéril) a 37°C, interpretado en el sistema como 0% de OD.

10.4.2.6 Preparación del inóculo

De los cultivos en frascos T, se tomó el volumen necesario de medio de cultivo con células para obtener un volumen final de 300 mL a una concentración de 0.2×10^6 cel/mL; se inoculó el reactor mediante una inyección hidrodinámica a través del sistema y se controlaron las condiciones empleando el software my-Control.

10.4.2.7 Muestreo en Biorreactor

Mediante presión hidrodinámica 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 por conteo con azul de tripano y cámara de Neubauer.

10.4.2.8 Control de los parámetros de cultivo

Las condiciones empleadas en el cultivo celular fueron establecidas de acuerdo a lo reportado en la literatura. Para ambas líneas celulares: pH= 7.1, Temperatura=37°C, OD=50%, Agitación= 180 rpm.

El pH de los cultivos se controló con inyección de gas CO₂ o de NaOH 0.4 M por goteo. El porcentaje de oxígeno disuelto se controló con la inyección de O₂ cuando se encontrara por debajo del valor fijado y N₂ cuando se encontrara por encima del mismo (50%). La temperatura fue controlada con una manta de calentamiento y la agitación con un impulsor de paletas inclinadas específico para cultivo de células animales.

10.5 Cinéticas de crecimiento celular

Las cinéticas se realizaron por determinación de concentración y viabilidad celular con cámara de Neubauer cada 12 o 24 horas. El tiempo de duración del cultivo fue determinado por la viabilidad celular que debía ser mayor al 90% al inicio del cultivo y 70% al momento del paro. La velocidad específica de crecimiento fue calculada mediante una regresión lineal al graficar el logaritmo natural de las

concentraciones celulares en la fase de crecimiento exponencial contra las horas de cultivo transcurridas (ver consideraciones matemáticas).

10.5.1 Determinación del tamaño celular relativo

Se empleó el contador electrónico de partículas Beckman Coulter Multisizer 3 (con un tubo de apertura de 70 micras) con solución salina 0.9% como medio de transporte de las células. La calibración del equipo se realizó empleando esferas de látex de diámetro conocido.

El principio físico con el que el equipo opera se denomina “Zona de Detección Eléctrica (Electrical Sensing Zone) y genera información sobre el número, masa, volumen y tamaño del área superficial de las partículas a analizar. Dicha información es generada cuando cada partícula pasa por un orificio por el cual es aplicado un voltaje y ésta genera cambios en la resistencia presente entre dos electrodos opuestos, generando pulsos en el voltaje que son interpretados por el equipo de acuerdo al tamaño del pulso generado.

10.6 Sistema de Elutriación Centrífuga a contracorriente JE-6B

El sistema de EC a contracorriente es un sistema de separación de células compuesto por un sistema de circulación de fluido acoplado a una cámara de separación celular en un rotor JE-6B (Beckman). La fuerza de rotación es generada por una ultracentrífuga J2-21 de Beckman (Véase figura 4).

El sistema se compone de:

1. Jeringa y válvula de paso de 3 vías “*By pass*” con entrada de jeringa (luer lock).
2. Bomba peristáltica de velocidad variable Gilson Minipulse 3.
3. Cámara de mezclado.
4. Manómetro.
5. Cámara de elutriación Estándar.
6. Rotor JE-6B.
7. Ultracentrífuga J2-21.

8. Manguera de silicón (Nalgene) de pared delgada y DI 3.9 mm para el flujo de la suspensión celular por todo el sistema, excepto en el paso por la bomba peristáltica.
9. Manguera Tygon impermeable a gases de pared delgada y DI 4.0 mm para hacer fluir el medio de elutriación a través de la bomba peristáltica.

Una vez que el medio de elutriación se encuentra distribuido por todo el sistema de elutriación, una suspensión celular concentrada fue inyectada al sistema por la cámara de mezclado empleando el *By pass*; con la ultracentrífuga encendida a 1500 rpm's y la bomba peristáltica trabajando a flujos en los que la suspensión celular no alcance la frontera de elutriación, se introdujo la suspensión celular a la cámara de elutriación estándar. Las células fueron colectadas en fracciones de acuerdo a los flujos de elutriación calculados y se determinó la concentración, viabilidad celular y el contenido de DNA de cada fracción para calcular pureza y rendimiento del sistema.

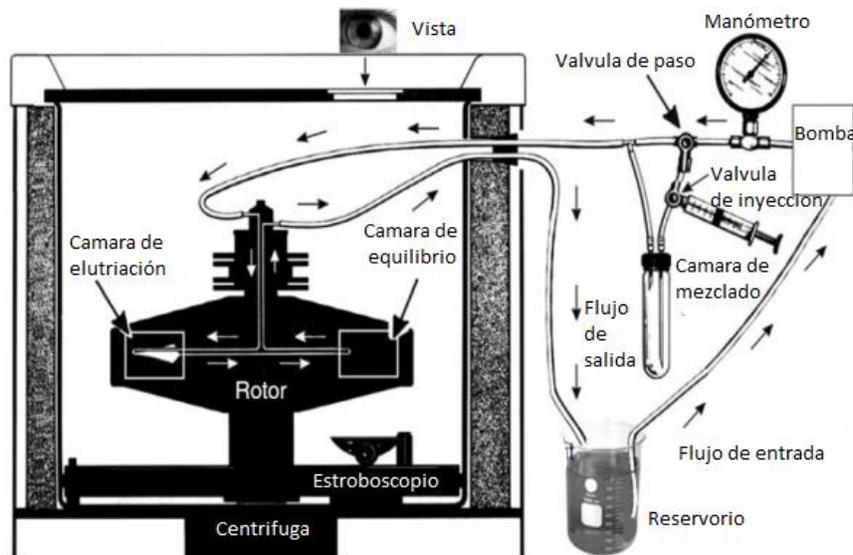


Figura 4. Elementos del sistema de elutriación y rotor acoplado a ultracentrífuga. Tomado de Developing Elutriation Protocols, Technical information, Beckman Instruments Inc. 1994.

10.6.1 Líneas de inyección y de transporte de fluido

Todas las líneas de transporte de fluido del sistema de elutriación emplearon mangueras de silicón (Nalgene) de pared delgada y de DI de 3.9 mm. El sistema de inyección de células está constituido por una jeringa y una válvula de paso de 3 vías con una entrada de jeringa (luer lock) específica para la inyección de muestra. Para la circulación de fluido se emplea una bomba peristáltica de velocidad variable (Gilson minipuls 3). El sistema cuenta también con una cámara para disminuir perturbaciones durante la inyección y un manómetro como indicador de la presión interna en el sistema. Los cambios de presión interna en el sistema disminuyen al eliminar las burbujas presentes en la cámara de elutriación, por lo que antes de inyectar la suspensión celular se debió estar seguro de la ausencia de burbujas en el sistema.

10.6.2 Ultracentrífuga, Rotor y Cámara de Elutriación.

Se empleó una ultracentrífuga análoga J2-21 (Beckman), diseñada para operar a velocidades elevadas.

El rotor acoplado a la ultracentrífuga es 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 ensambla la cámara de elutriación. Para el presente proyecto se utilizó la cámara Standard (Véase figura 3). Dicha cámara presenta una forma cónica, de 4.2 mL de volumen y con una capacidad máxima de separación de 10^7 a 10^9 células. Por el puerto de entrada ingresa la suspensión celular para, después de pasar por la frontera de elutriación, coleccionar poblaciones celulares de un mismo tamaño celular.

10.6.3 Curva de calibración Bomba Peristáltica MiniPuls 3 Gilson.

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

Para la calibración de la bomba se tomaron volúmenes por triplicado de agua miliQ durante un minuto en intervalos de 8 rpm's y con la ultracentrífuga en funcionamiento. Los flujos (mL/min) de agua miliQ obtenidos para cada condición de la bomba fueron colectados en tubos cónicos vacíos pesados previamente y se calculó por diferencia de peso el volumen colectado durante un minuto. Se graficó el promedio de los flujos obtenidos para cada rpm usada y se realizó una regresión lineal. La ecuación generada se empleó para determinar los flujos a emplear en la colecta de fracciones celulares elutriadas considerando la ecuación de la ley de Stokes (ver anexo 1).

10.6.3.1 Curva de calibración de la bomba peristáltica a 1500 rpm de velocidad del rotor de elutriación.

Se utilizó una manguera Tygon de silicón de 4.0 mm de DI y de pared delgada. Se tomaron volúmenes por triplicado de agua miliQ durante un minuto a las velocidades de la bomba 8, 16, 24, 32, 40 y 48 rpm en un tubo cónico de 50 mL pesado previamente; con los valores de flujo promedio obtenidos se construyó la curva de calibración de la bomba.

10.6.4 Procedimiento general de Elutriación Centrifuga.

Una vez conectado el sistema (Bomba Peristáltica- ultracentrífuga) se llevó al rotor a la velocidad de trabajo de 1500 rpm's. El flujo de la bomba peristáltica se tuvo muy por debajo del flujo de trabajo calculado para evitar que las células al ser inyectadas cruzaran la frontera de elutriación dentro de la cámara de elutriación y se perdieran durante su inyección al sistema. La presión interna del sistema en funcionamiento no debe pasar de 10 libras.

- 1) Previo a inyectar las células se hizo circular etanol al 70% por un tiempo aproximado de 15 min para sanitizar el sistema.
- 2) Se circuló PBS 1x estéril durante 15 minutos para retirar el etanol dentro del sistema.

- 3) Se circuló el medio de elutriación durante 10 minutos para retirar el PBS 1x y una vez asegurada la ausencia de burbujas en el sistema se tomaron tres muestras a un mismo flujo para corroborar la calibración de la bomba peristáltica y ajustar los flujos de ser necesario.
- 4) Se inyectó la muestra de células (aproximadamente 5 mL) a un flujo de 1 mL/min.
- 5) Una vez que las células se encontraron en la cámara de elutriación se incrementó la velocidad de la bomba peristáltica a una razón de 1 mL/min hasta el flujo mínimo calculado en el cual las células más pequeñas alcanzan la frontera de elutriación.
- 6) Se colectaron las fracciones de interés incrementando el flujo de la bomba a razón de 1 mL/min de acuerdo a sus velocidades de sedimentación.
- 7) Una vez colectadas todas las fracciones de interés, se llevó la bomba peristáltica al máximo flujo y se apagó la ultracentrífuga con el fin de asegurar que la cámara quedara libre de restos celulares.
- 8) Se circuló etanol al 70% durante 15 minutos para sanitizar el sistema y finalmente se apagó la bomba peristáltica. El sistema de elutriación quedó con etanol al 70%.

10.6.4.1 Inyección de células no sincronizadas al sistema de elutriación.

De un cultivo de células no sincronizadas en minibiorreactor se tomó el volumen de medio necesario para tener de 3 a 5×10^8 células. Se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos y el pellet celular obtenido se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo fresco. En una jeringa estéril de 10 mL se tomó el concentrado y se inyectó a través de la válvula de inyección del sistema de elutriación, cerrando el *by pass* y abriendo la válvula de inyección de muestra para que el medio de elutriación no pase por la cámara de mezclado y así sólo permita el paso de la suspensión celular. Se tomaron las precauciones para que el flujo de inyección de muestra no sobrepasara el flujo mínimo calculado para la obtención de la primera

fracción de células elutriadas. La inyección de muestra se realiza con la ultracentrífuga en funcionamiento.

10.7 Obtención del Barrido de ciclo celular

Siguiendo el procedimiento general de elutriación se colectaron diferentes fracciones a diferentes velocidades de flujo de acuerdo a los siguientes criterios:

- 1) Conociendo el diámetro de las células (CHO-DG44 y BCF2), se realizó el cálculo para determinar los flujos de fluido en las que se colectaran las fracciones en las diferentes fases del ciclo celular (véase apartado 10.9.2).
- 2) Como buffer de elutriación se empleó medio DMEM sin Suero Fetal Bovino (SFB).
- 3) Las fracciones de células BCF2 y CHO-DG44 se colectaron en intervalos de 1 y 2 mL/min respectivamente, en condiciones estériles y en tubos cónicos nuevos de 50 mL para la evaluación de la sincronía.
- 4) Una vez obtenida cada fracción en los tubos se tomó una muestra de 500 μ L para determinar la concentración celular de cada fracción colectada por conteo de células en cámara de Neubauer.
- 5) Posteriormente, se tomó el volumen necesario para obtener 1×10^6 células de cada fracción colectada para determinar contenido de DNA.

10.8 Arresto químico de CHO DG44 con DMSO.

Se realizaron cinéticas de crecimiento celular de CHO DG44 como se mencionó en el apartado 10.5. El agente químico de arresto DMSO se adicionó a los cultivos en volúmenes necesarios para lograr una concentración final (volumen/volumen) del agente químico al 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5% y 5.0% al inicio de cada cultivo en frascos T25.

10.9 Consideraciones matemáticas

10.9.1 Determinación de Flujos para colecta de fracciones de interés.

Con la distribución de los diámetros celulares determinados para cada línea celular y mediante la ecuación de Stokes simplificada (ecuación 5 del apartado 6.4.2) se determinaron los flujos teóricos a los cuales se obtendrían las poblaciones celulares de un diámetro específico. Para el presente trabajo nos interesó la separación de las poblaciones celulares que se encontraran en la fase G₁ del ciclo celular. Aparte, con la curva de calibración de la bomba peristáltica se convirtieron los valores de los flujos teóricos calculados a valores de velocidad de la bomba en RPM's.

10.9.2 Velocidad específica de crecimiento (μ).

Para calcular el valor de la velocidad específica de crecimiento (μ) durante el crecimiento exponencial de ambas líneas celulares se graficó el logaritmo natural del número de células viables contra el tiempo en horas. A la curva obtenida se le calcula una regresión lineal en la que el valor de la pendiente (m) equivale al valor de la velocidad específica de crecimiento (μ). La μ es propia de una línea celular en crecimiento exponencial bajo determinadas condiciones de cultivo. La μ sirve también para realizar cálculos predictorios sobre la concentración celular para los cultivos a un tiempo dado al sustituir su valor en la ecuación de crecimiento exponencial $\frac{d_x}{d_t} = \mu x$, de la cual al integrar se obtiene: $Ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t$

Donde X y X₀ son la concentración de las células viables al tiempo t y al inicio del cultivo respectivamente y μ es la velocidad específica de crecimiento.

10.9.3 Velocidad específica de consumo y producción de metabolitos (q).

Para calcular el valor de la velocidad específica (q) de consumo de Glucosa y Glutamina o producción de Lactato, fue necesario conocer las concentraciones iniciales y finales de los metabolitos en el medio (mol/Litro), las concentraciones

celulares iniciales y finales (células/Litro), el tiempo de cultivo y la velocidad específica de crecimiento de las líneas celulares.

Para los casos donde se tenían condiciones típicas de crecimiento no sincronizado en la fase exponencial se empleó la ecuación:

$$q = \left| \frac{(M)_f - (M)_i}{(Xv)_f - (Xv)_i} \right| \mu$$

Para los cultivos bajo condiciones de sincronía obtenida por EC o arresto celular por el efecto del DMSO se empleó la ecuación:

$$q = \frac{\left| \frac{(M)_f - (M)_i}{(Xv)_f - (Xv)_i} \right|}{t}$$

Para ambas ecuaciones M es la concentración molar (Mol/L) del metabolito a evaluar al inicio (i) o al final (f) del cultivo, Xv la concentración celular viable (cel/L) al inicio (i) y al final (f) del estudio, μ es la velocidad específica de crecimiento (1/h), t es el periodo de tiempo a evaluar y q es la constante de velocidad de consumo o producción de los metabolitos evaluados.

En el caso de cultivos en los que se modificó el modo de proliferación de forma no sincronizada a sincronizada, la μ que se obtiene no es representativa, por lo que para los cálculos de q en esas circunstancias conviene determinarla solamente durante un periodo de tiempo " t ". Ambas ecuaciones reflejan el consumo o producción de metabolitos por cada célula en una hora de cultivo, por ejemplo, en $\mu\text{mol/cel}^*\text{h}$.

10.10 Determinaciones analíticas.

10.10.1 Concentración y viabilidad celular.

Para determinar la concentración celular se tomó una muestra del cultivo y se empleó la técnica de exclusión de colorante por medio del colorante azul de Tripano al 0.2% en PBS y conteo 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 vivas permanecen refringentes.

10.10.2 *Cuantificación y concentración de glucosa, lactato y glutamina.*

Estos tres metabolitos se determinaron enzimáticamente en un multianalizador YSI modelo 2700 (Yellow Spring Instruments, CO). Este analizador 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, generándose 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 problema.

10.10.3 *Determinación del contenido de DNA por citometría de flujo.*

10.10.3.1 Fijación celular

Se tomó medio de cultivo donde se tuviera 1×10^6 células y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y el pellet celular contenido en aproximadamente 200 μ L se vertió gota a gota y con agitación vigorosa a un tubo de citómetro con 2 mL de etanol al 70% frío para evitar aglomerados. Las células ya en etanol se fijaron durante al menos una hora a -20 °C. El fijado celular tiene la finalidad de no dañar el DNA y de permeabilizar las membranas celulares, facilitando la entrada del colorante al núcleo celular durante el proceso de tinción de DNA.

10.10.3.2 Tinción de DNA

El tubo con las células fijadas fue centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos y decantado para eliminar el etanol. Las células se lavaron con 1mL de PBS 1x frío, mismo que fue centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y a las células se les adicionó 10 μ L de la enzima RNAsa a una concentración de 10 mg/mL, 40 μ L de ioduro de propidio a una concentración de 1 mg/mL y 950 μ L de PBS 1x. Las células ya teñidas fueron incubadas a 37° C durante 20 minutos en ausencia de luz.

10.10.3.3 Lectura en citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson).

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 fue leída a una velocidad de 12 μ L por minuto y los gráficos fueron generados a partir de un análisis de 10000 eventos usando los detectores FSC (dispersión de luz frontal), SSC (dispersión de luz lateral), FL2-Area y FL2-Ancho, realizando discriminación de dobletes, tripletes y “debris” celular.

10.11 Análisis estadístico de datos

Para el análisis estadístico de las curvas de calibración de la bomba peristáltica y de los conteos celulares (cinéticas de crecimiento) se usaron los siguientes parámetros de estadística descriptiva:

- Desviación estándar (σ) como medida de centralización o dispersión de los datos.
- Coeficiente de variación (CV): su fórmula expresa la desviación estándar como porcentaje de la media aritmética, mostrando una mejor interpretación porcentual del grado de variabilidad que la desviación típica o estándar. A mayor valor del coeficiente de variación mayor heterogeneidad de los valores y a menor CV mayor homogeneidad en los valores de la variable.

- Coeficiente de correlación (r): el coeficiente de correlación lineal mide el grado de relación entre las variables cuando dicha relación es lineal. La correlación es tanto más fuerte cuanto más se aproxime a 1.

10.12 Reactivos

10.12.1 PBS 10x

Se pesaron las siguientes sales:

- 82 g de NaCl (Baker No. Catálogo 3624-05)
- 2.0 g de KCl
- 14.4 g de Na₂HPO₄ (J.T Baker)
- 2.4 g de KH₂PO₄ (Sigma No.catálogo P5655)

Las sales fueron disueltas en un litro de agua milliQ estéril, se ajustó pH de la solución a 7.2 con NaOH 0.5 M y HCl 1.0 M y se esterilizó por membrana de 0.22 micras dentro de la campana de flujo laminar.

10.12.2 Azul de Tripano

- Se pesó 0,2 g del colorante azul tripano (Sigma No. Catálogo T0776)
- De la solución de PBS 10X se realizó una dilución 1:10 (PBS 1x) para preparar 100 mL del colorante a una concentración de 0.2 % .
- El colorante fue solubilizado, filtrado por membrana de 0.22 micras y alicuotado en tubos de fondo cónico de 50 mL.

10.12.3 L-Glutamina 200 mM

- Se pesó 2,99g de L-Glutamina (Sigma No. Catálogo G8540) y fue disuelta en 50 mL de agua milliQ estéril por calor.
- Se aforó a un volumen final de 100 mL .
- Se filtró por membrana 0,22 micras y se alicuotó en tubos cónicos estériles de 15 mL con 10 mL cada uno.
- Se almacenó a -20°C

10.12.4 Ioduro de Propidio 1 mg/mL

- Se pesó 0,001g de colorante fluorescente ioduro de propidio (Sigma P-470).
- Se re suspendió en un mililitro de PBS 1X en un tubo eppendorf de 1.5 mL
- Se conservó a 4°C en oscuridad.

10.12.5 RNAasa 10 mg/mL

- Se pesó 10 mg de la enzima
- Se re suspendió en 1 mL de PBS 1x y se alicuotó en varios tubos eppendorf de 0.6 mL.
- Se conservó a -20°C

11. Resultados y Discusiones

Los resultados obtenidos se presentan de la siguiente forma: 1) Caracterización del crecimiento celular de CHO DG44 e hibridoma murino BCF2, 2) Separación y Caracterización de Poblaciones de Hibridoma Murino BCF2 y CHO DG44 de acuerdo a su contenido de DNA en las diferentes fases del ciclo celular mediante EC a contracorriente, 3) Cultivo en minibiorreactor de dos fracciones celulares sincronizadas en la fase G_1 del ciclo celular del hibridoma murino BCF2, y 4) Prueba de estabilidad y Arresto químico con DMSO de CHO DG44.

11.1 Caracterización del crecimiento celular de CHO DG44 e hibridoma murino BCF2.

11.1.1 Caracterización cinética del crecimiento y metabolismo de CHO DG44.

Se realizaron cinéticas de crecimiento en frascos T y en minibiorreactor muestreando cada 24 horas con la finalidad de obtener un perfil de crecimiento. En cada muestra se evaluó la concentración de células viables por mL (X_v), concentración celular total (X_t) y la viabilidad celular ($\%X_v$). En las figuras 5 y 6 se muestran los perfiles de crecimiento obtenido en los cultivos realizados en frascos.

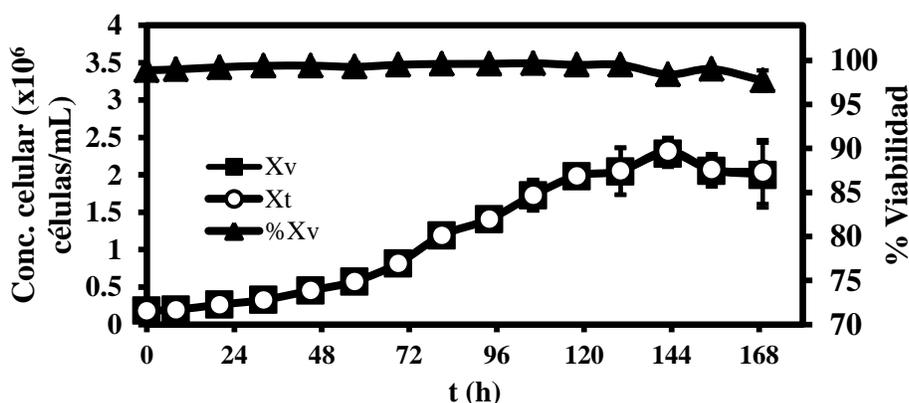


Figura 5. Cinética de crecimiento CHO-DG44 en frascos T25. Medio de cultivo CD OptiCHO. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de tres repeticiones.

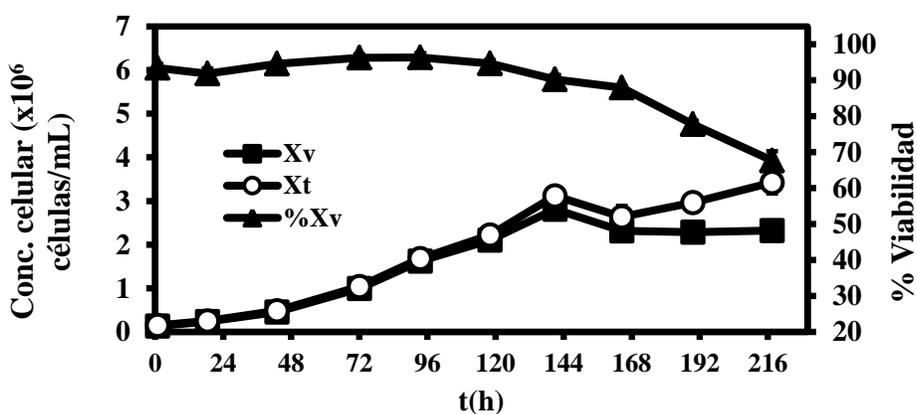


Figura 6. Cinética de crecimiento CHO-DG44 en frascos T75. Medio de cultivo CD OptiCHO. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de tres repeticiones.

En ambas figuras se aprecia que la viabilidad de los cultivos empieza a decaer a partir de las 144 horas y comienza a presentarse una inhibición en el crecimiento celular. Lo anterior debido probablemente a la presencia de lactato y amonio en altas concentraciones y generados por la degradación de glucosa y glutamina respectivamente (Ahn and Antoniewicz, 2011; Glacken, 1985), en virtud de que no hubo un agotamiento de nutrientes (Figura 8) a ese tiempo de cultivo.

En promedio, las concentraciones celulares máximas alcanzadas a las 144 horas fueron 2.55×10^6 células/mL con una viabilidad del 94% en medio CD OptiCHO. Se observa en la figura 6 que a las 216 horas la viabilidad ha disminuido hasta un 70%. La desviación estándar de los datos de la gráfica 6 tuvo un valor menor a 0.240 para las células viables y totales y menor a 2.5% para la viabilidad, por lo que no son perceptibles en la figura.

Un cultivo representativo del comportamiento cinético del crecimiento en minibiorreactor y en medio Cellvento 100 se muestra en la figura 7. El cultivo se inició con un inóculo de baja concentración (0.127×10^6 cel/mL) y la máxima concentración de células viables alcanzada fue 2.247×10^6 células/mL. Se observa un perfil de crecimiento exponencial como el observado en los cultivos en frascos tipo T, lo cual alude a la estabilidad del sistema al controlar las condiciones

ambientales en el cultivo. Las condiciones de cultivo fueron establecidas en OD = 50%, pH = 7.2, T = 37°C y Agitación de 180 rpm. Para el control de pH de los cultivos de CHO DG44 fue necesario la adición NaOH 0.4 M por goteo directo después de alcanzar una concentración de 1×10^6 células/mL. A las 120 horas se observa un aumento considerable en el número de células en el cultivo, lo que llevó a una demanda mayor de gases, principalmente aire. La Agitación fue constante durante el cultivo.

Las células de dicho cultivo fueron procesadas por EC para obtener un perfil de poblaciones elutriadas que se muestra en la sección 11.3. Las células fueron cosechadas a las 144 horas con la finalidad de que las células a elutriar se encontraran con una viabilidad mayor al 95%. Con el medio de cultivo Cellvento 100 la concentración celular máxima observada para cultivos de células CHO DG44 en minibiorreactor fue de 3.11×10^6 células/mL y una viabilidad del 90.2 % (no se muestra cultivo).

El control de las condiciones ambientales, principalmente el pH, y el uso del medio de cultivo Cellvento 100 para los cultivos en minibiorreactor llevaron a alcanzar mayores concentraciones de células viables en los minibiorreactores a diferencia de los cultivos en frascos T en donde no hubo un control ambiental riguroso y el medio que se empleó fue CD OptiCHO.

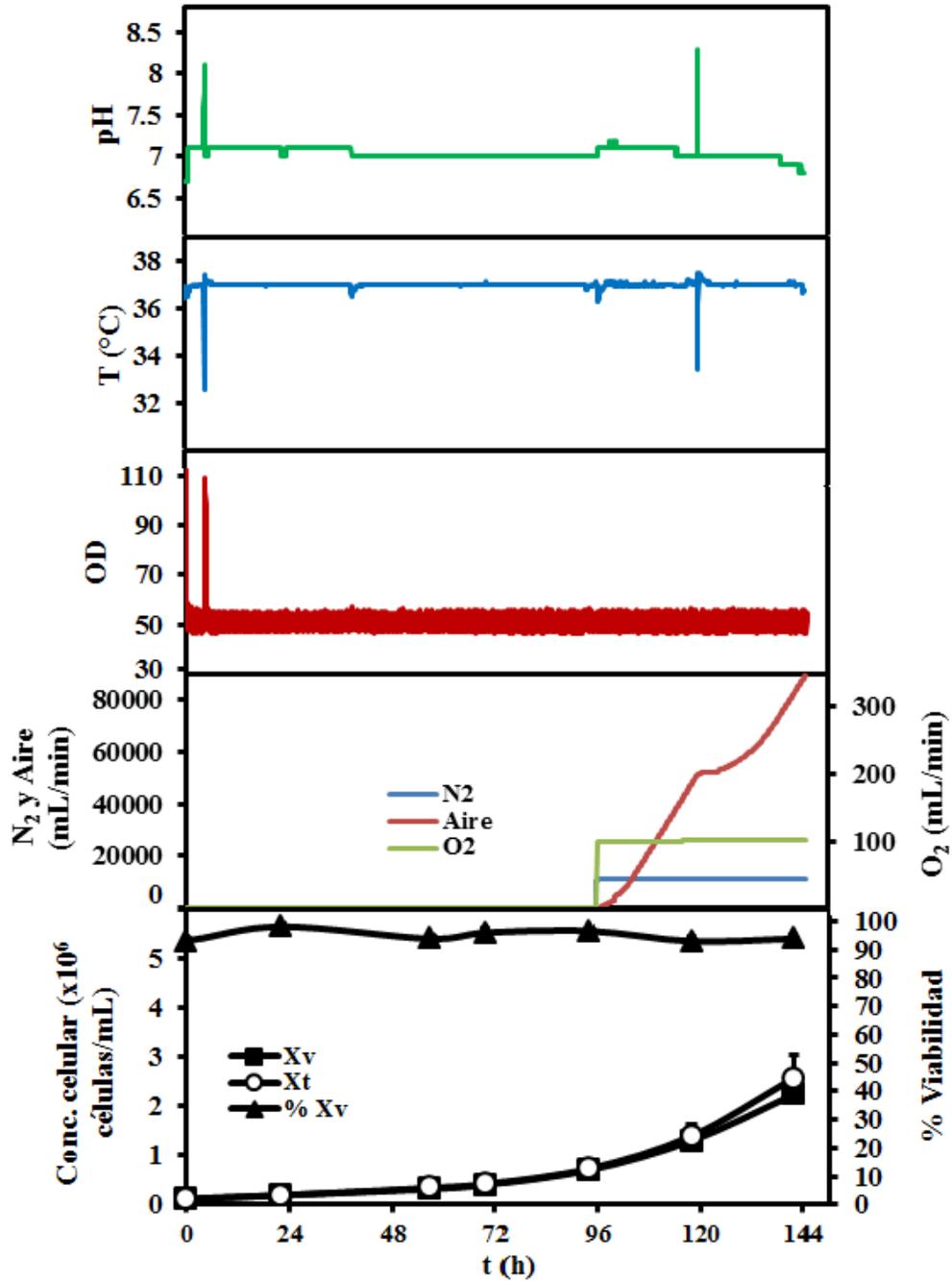


Figura 7. Cinética de crecimiento de CHO DG44 en Minibiorreactor Instrumentado Applikon con control de las condiciones de cultivo. Medio Cellvento 100. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de tres repeticiones.

11.1.1.1 Perfil cinético del consumo y producción de metabolitos de células CHO DG44 en frascos T-75.

Durante las cinéticas de crecimiento se tomaron muestras con las que se determinó el perfil de consumo de Glucosa (Glc) y Glutamina (Gln) y la producción de Lactato (Lac). En la figura 8 se muestra el perfil metabólico del cultivo de células CHO DG44 mostradas en la figura 6.

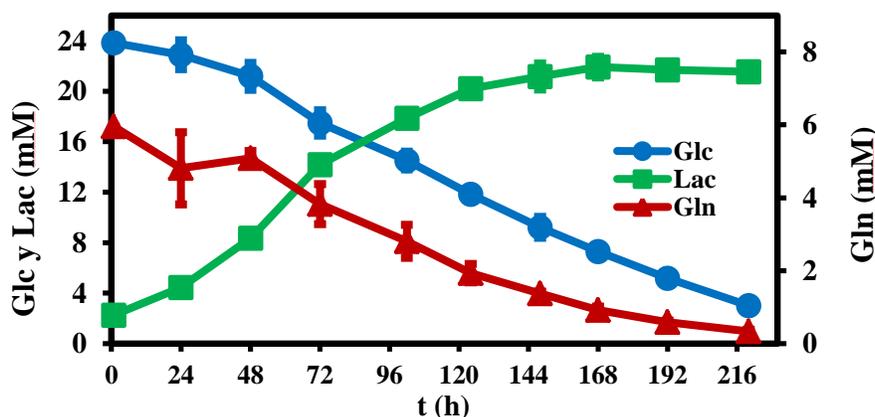


Figura 8. Perfil metabólico de células CHO en cultivo estático. Medio de cultivo CD OptiCHO.

Häggström (2003) reportó una producción de 8 a 35 mM de Lac en un cultivo tipo Batch en donde se tuvieron inicialmente 25 mM de Glc y 4 mM de Gln, y velocidades máximas de consumo (q) de 0.291 pmol/cel*h y 0.100 pmol/cel*h para glucosa y glutamina respectivamente a bajas concentraciones de nutrientes (5 mM de Glc y 3.5 mM de Gln).

A pesar de haber Glucosa y Glutamina presentes en el medio de cultivo, a partir de las 144 horas la producción de Lactato y el crecimiento celular se detuvieron (Figura 6 y 8). La inhibición de la producción de Lactato se explica por la falta de viabilidad celular y porque a bajas concentraciones de nutrientes (Glc y Gln) el metabolismo de células transformadas es más eficiente (Xie and Zhou, 2006; Ahn and Antoniewicz, 2011; Glacken, 1985). Una glucólisis acelerada, ocasionada por alta concentración de nutrientes, está relacionada a una alta producción de Lactato como producto final incluso bajo condiciones aerobias, lo que indica que

un bajo porcentaje del piruvato generado por la degradación de Glucosa es incorporado al Ciclo de Krebs, que es una vía mucho más eficiente en el aspecto energético, para una oxidación completa hasta CO_2 y H_2O (Gódia and Cairó, 2006).

Las velocidades de consumo de Glucosa y Glutamina y de producción de Lactato determinadas fueron q_{Glc} de 0.131 pmol/cel*h, q_{Gln} de 0.041 pmol/cel*h y q_{Lac} de 0.169 pmol/cel*h, mostrando un rendimiento de 1.2 moles producidos de Lac por mol consumido de Glc, valores cercanos a lo reportado por Ahn y Antoniewicz (2011) para un cultivo de células CHO K1 en medio DMEM (q_{Glc} de 0.201 pmol/cel*h, q_{Gln} de 0.036 pmol/cel*h y q_{Lac} de 0.299 pmol/cel*h y rendimiento de 1.5 mol Lac/mol Glc) a pesar de ser líneas celulares y medio de cultivo diferentes; sin embargo, Häggström (2003) menciona que el rendimiento Lac/Glc en cultivos por lotes (Batch) se encuentra en el rango de 1.4 a 2 mol/mol y que está sujeta al medio de cultivo en donde se evalúe. Serrato et.al. (2007) encontraron diferencias en los rendimientos Lac/Glc obtenidos al cultivar hibridoma murino en diversos medios de cultivo, 1.44 en medio con suero fetal bovino, 1.89 en DMEM y 1.59 CD Hybridoma, siendo los últimos dos químicamente definidos.

Teóricamente, en la glucólisis (proceso bioquímico de degradación de Glucosa) por cada molécula de Glucosa se generan 2 moléculas de piruvato (Müller-Esterl W, 2008), que en presencia de H^+ son reducidas a Lactato (Voet et al., 2009).

11.1.2 Caracterización cinética del crecimiento de hibridoma murino BCF2.

La caracterización de la línea celular hibridoma murino BCF2 no abarcó los mismos aspectos que se evaluaron con CHO DG44 en virtud de que ésta línea celular ya ha sido caracterizada previamente en el laboratorio. Se corroboró el comportamiento cinético del hibridoma murino BCF2 con los resultados reportados previamente por Serrato et al. (2007).

La constante de la velocidad de crecimiento celular para un cultivo de hibridoma murino BCF2 en minibiorreactor instrumentado en medio CD hybridoma (figura 9) fue 0.0401 h^{-1} , resultado similar a lo determinado por Serrato et.al. en 2007 (0.0400 h^{-1}).

En la figura 9 se observan los perfiles de las variables de cultivo controladas mediante el software empleado con el minibiorreactor. A pesar de iniciar con una baja concentración celular ($0.076 \times 10^6 \text{ cel/mL}$), el sistema introdujo aire y N_2 desde el inicio del cultivo, a diferencia de lo observado en el cultivo de células CHO DG44 (Figura 7). Las variaciones de pH también se hicieron presentes desde el inicio hasta las 48 horas en que se estabilizó el cultivo. A diferencia de los cultivos de células CHO DG44, los de hibridomas fueron de menor duración, sin embargo, se requirió de un mayor control de las condiciones del cultivo por lo que CHO DG44 se muestra como una línea celular más robusta que los hibridomas murinos.

El presente cultivo se detuvo a las 87 horas en virtud de que las células se utilizaron para elaborar una EC y ya se encontraban con alta densidad y viabilidad celular para las 87 horas.

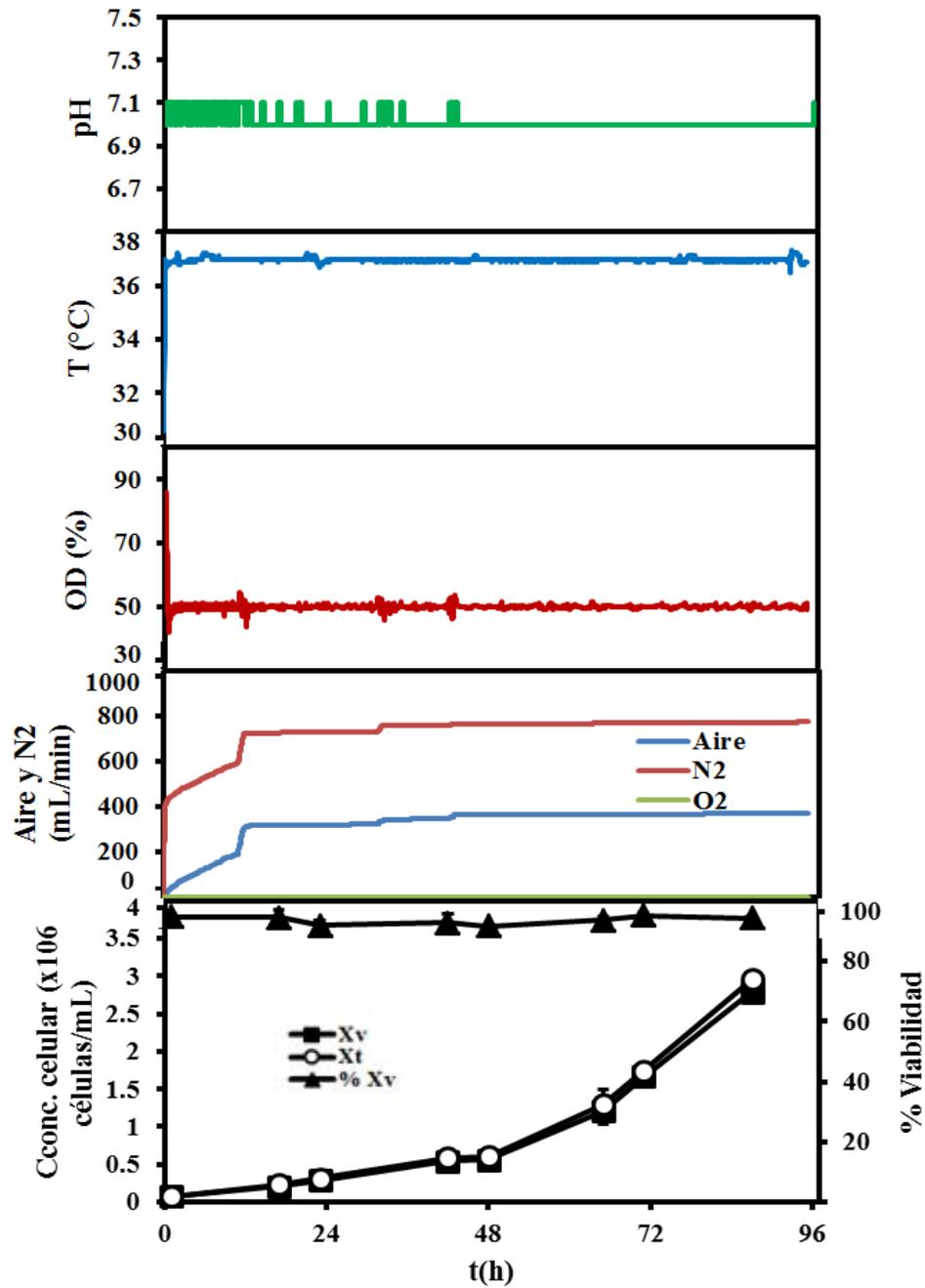


Figura 9. Cinética típica de crecimiento de hibridoma murino BCF2 en Minibiorreactor Instrumentado Applikon. Medio CD Hybridoma.

11.2 Separación y Caracterización de Poblaciones de Hibridoma Murino BCF2 y CHO DG44 de acuerdo a su contenido de DNA en las diferentes fases del ciclo celular mediante Elutriación Centrífuga a contracorriente.

El objetivo principal del trabajo fue obtener poblaciones celulares sincronizadas en la fase G₁ del ciclo celular a las que se pudiera estudiar su comportamiento cinético en minibiorreactor. Se utilizaron dos líneas celulares, CHO DG44 e hibridoma murino BCF2.

- Se determinó el diámetro celular de ambas líneas celulares.
- Mediante EC se realizó una separación de poblaciones de ambas líneas celulares con base a su tamaño celular con la finalidad de identificar a la población más sincronizada con respecto al ciclo celular.

11.2.1 Determinación del diámetro celular.

Se determinó el diámetro celular usando un contador electrónico de partículas Beckman Coulter Multisizer 3. Al analizar una muestra de células en cultivo creciendo en fase exponencial, el equipo determina la distribución de tamaño y lo representa mediante un histograma donde la altura de cada barra es el número de células con determinado diámetro (véase Figura 10 y 11). Se determinó que el rango de diámetros de una población no sincronizada se encuentra mayoritariamente entre 12 y 18 micras para el hibridoma murino BCF2 (Figura 10) y entre 10 y 19 micras para CHO DG44 (Figura 11).

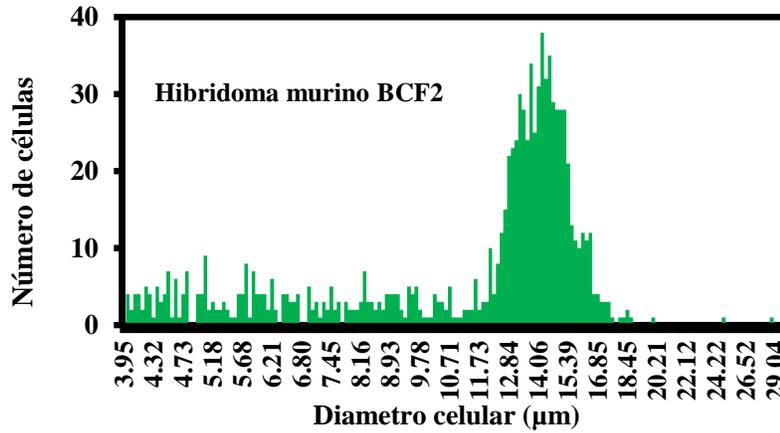


Figura 10. Histograma de distribución de diámetros de Hibridoma murino BCF2 realizada en Coulter Multisizer.

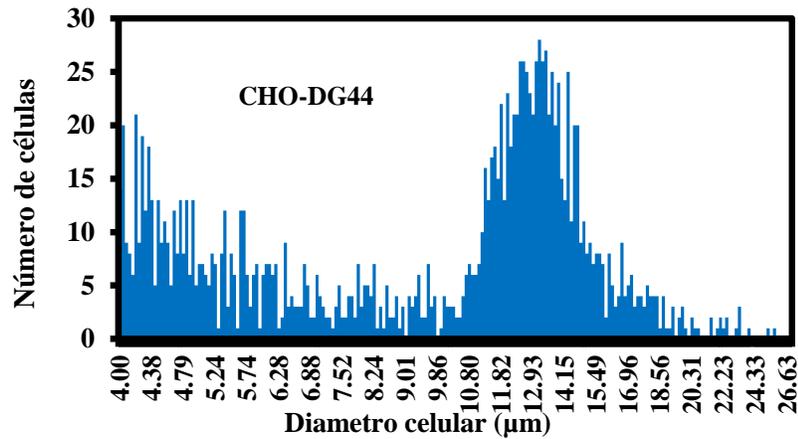


Figura 11. Histograma de distribución de diámetros de CHO-DG44 realizada en Coulter Multisizer.

11.2.2 Curva de calibración de la bomba peristáltica.

Se calibró la bomba peristáltica Gilson Minipulse 3 empleada en el sistema de elutriación de acuerdo a como se indica en el inciso 10.6.3 de los Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Flujos obtenidos en la curva de calibración de la bomba peristáltica acoplada a la ultracentrífuga a 1500 rpm de velocidad de centrifugación del rotor de elutriación.

| Bomba (rpm) | Flujo sistema (mL/min) | | | Promedio | SD | CV% |
|-------------|------------------------|-------|-------|----------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| 8 | 6.8 | 7.16 | 6.96 | 6.97 | 0.18 | 2.59 |
| 16 | 14.19 | 14.31 | 14.16 | 14.22 | 0.08 | 0.56 |
| 24 | 21.12 | 21.26 | 21.28 | 21.22 | 0.09 | 0.41 |
| 32 | 28.33 | 28.21 | 28.03 | 28.19 | 0.15 | 0.54 |
| 40 | 35.49 | 35.45 | 35.19 | 35.38 | 0.16 | 0.46 |
| 48 | 41.97 | 42.14 | 42.37 | 42.16 | 0.2 | 0.48 |

La regresión lineal de los datos generados mostró una linearidad del 0.999 y una pendiente de 0.880 rpm^{-1} , con la cual se convirtieron las rpm's de la bomba a flujos en mL/min, necesarios para la separación de poblaciones celulares. La obtención de resultados con alta linearidad y repetibilidad aseguran flujos estables dentro del sistema por parte de la bomba peristáltica y de la ultracentrífuga, lo cual fue necesario para poder ajustar los flujos de la bomba al momento de realizar la separación celular de acuerdo a los diámetros de las células.

11.2.3 Cálculo de los flujos de elutriación.

Una vez obtenida la distribución de tamaño de las líneas celulares y el valor de la pendiente de los datos de la calibración de la bomba peristáltica se calcularon los flujos teóricos de separación de las diferentes poblaciones celulares de acuerdo a su tamaño empleando la ecuación simplificada de ley de Stokes (Ecuación 5 del apartado 6.4.2).

Como se observa en la Tabla 2, para el hibridoma murino, partículas con diámetros mayores a $11.8 \mu\text{m}$ eluyen a partir de 16 mL/min, de modo que el debrí celular (restos celulares) se encontrará en las fracciones que eluyen a menores flujos; lo mismo ocurre para el caso de CHO DG44 (tabla 3) pero a partir de un flujo de 10 mL/min y partículas de $9.33 \mu\text{m}$ de diámetro.

Tabla 2. Flujos de separación teóricos para hibridoma murino BCF2 obtenidos por la Ley de Stokes simplificada.

| Fracción | Flujo (ml/min) | Diámetro (µm) | Bomba (rpm) |
|----------|----------------|---------------|-------------|
| 1 | 16 | 11.8 | 19.6 |
| 2 | 17 | 12.2 | 20.9 |
| 3 | 18 | 12.5 | 22.2 |
| 4 | 19 | 12.9 | 23.4 |
| 5 | 20 | 13.2 | 24.7 |
| 6 | 21 | 13.5 | 25.9 |
| 7 | 22 | 13.8 | 27.2 |
| 8 | 23 | 14.1 | 28.4 |
| 9 | 24 | 14.4 | 29.7 |
| 10 | 25 | 14.7 | 30.9 |
| 11 | 26 | 15.0 | 32.2 |
| 12 | 27 | 15.3 | 33.4 |
| 13 | 28 | 15.6 | 34.7 |
| 14 | 29 | 15.9 | 36.0 |
| 15 | 30 | 16.2 | 37.2 |
| 16 | 31 | 16.4 | 38.5 |
| 17 | 32 | 16.7 | 39.7 |
| 18 | 33 | 16.9 | 41.0 |
| - | 34 | 17.2 | 42.2 |

Tabla 3. Flujos de separación teóricos para CHO DG44 obtenidos por la Ley de Stokes simplificada.

| Fracción | Flujo (ml/min) | Diámetro (µm) | Bomba (rpm) |
|----------|----------------|---------------|-------------|
| 1 | 10 | 9.33 | 12.1 |
| 2 | 11 | 9.78 | 13.3 |
| 3 | 12 | 10.22 | 14.6 |
| 4 | 13 | 10.63 | 15.8 |
| 5 | 14 | 11.03 | 17.1 |
| 6 | 16 | 11.8 | 19.6 |
| 7 | 18 | 12.51 | 22.1 |
| 8 | 20 | 13.19 | 24.6 |
| 9 | 22 | 13.83 | 27.1 |
| 10 | 24 | 14.45 | 29.6 |
| 11 | 26 | 15.04 | 32.1 |
| 12 | 28 | 15.61 | 34.6 |
| 13 | 30 | 16.15 | 37.1 |
| 14 | 32 | 16.68 | 39.6 |
| 15 | 34 | 17.2 | 42.1 |
| 16 | 36 | 17.69 | 44.6 |
| - | 38 | 18.18 | 47.1 |

11.2.4 Barridos de poblaciones celulares separadas con base al tamaño.

Una vez calculados los flujos teóricos para separar poblaciones de células no sincronizadas en crecimiento exponencial (Tablas 2 y 3), se realizó la separación mediante EC con la finalidad de obtener un perfil de contenido de DNA en las diferentes fracciones elutriadas con base en su diámetro celular y para evaluar su pureza.

En las figuras 12 y 13 se muestran las determinaciones de contenido de DNA para cada una de las fracciones elutriadas de células BCF2 y CHO DG44 respectivamente. Para ambas líneas celulares se muestran dos poblaciones control al inicio.

De acuerdo al análisis mostrado en la figura 2, el perfil de elutriación del Hibridoma murino BCF2 mostró una separación de poblaciones celulares en cada fase del ciclo celular. En las fracciones 5 a 7 se observaron poblaciones celulares altamente sincronizadas en la fase G₁ del ciclo celular; en las fracciones 8 a 12 se observan también células con el contenido de DNA propio de las células en fase G₁ pero mezcladas con células que comienzan a entrar a la fase S por lo que la pureza de ambas subpoblaciones no es muy alta; conforme aumenta la velocidad de flujo va incrementando la cantidad de células en fase S, como se observa en las fracciones 13 a 16, y finalmente en las fracciones 17 y 18 se comenzó a observar una población con mayor contenido de células en la fase G₂ del ciclo celular que en las fracciones anteriores.

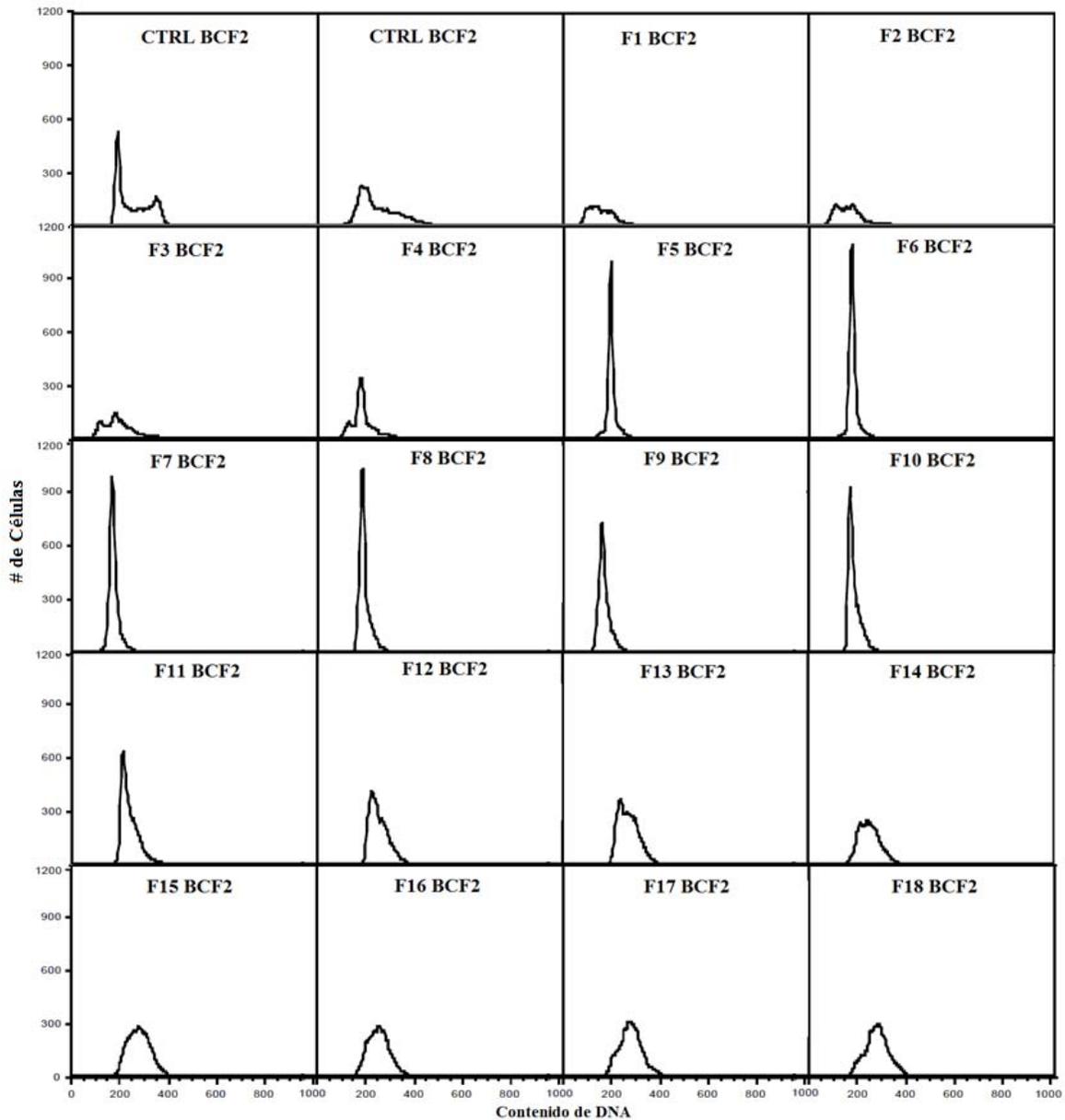


Figura 12: Contenido de DNA de poblaciones celulares de hibridoma murino BCF2 obtenidas por EC.

En cambio, en el perfil de elutriación de células CHO DG44 se observó que en las primeras fracciones se obtienen poblaciones altamente sincronizadas en la fase G₁ del ciclo celular (F2, F4 y F5). A medida que aumentan los flujos de elutriación las poblaciones altamente sincronizadas en G₁ disminuyen y las células en fase S empiezan a eluir (F6, F7 y F8). A partir de la fracción 9 se observa que el

contenido de DNA es semejante al de una población no sincronizada. Lo anterior, se justifica probablemente por la aglomeración observada y ocurrida entre las células en el interior de la cámara de elutriación durante la separación, por lo que no se logró obtener poblaciones celulares enriquecidas en las fases S y G₂ del ciclo celular.

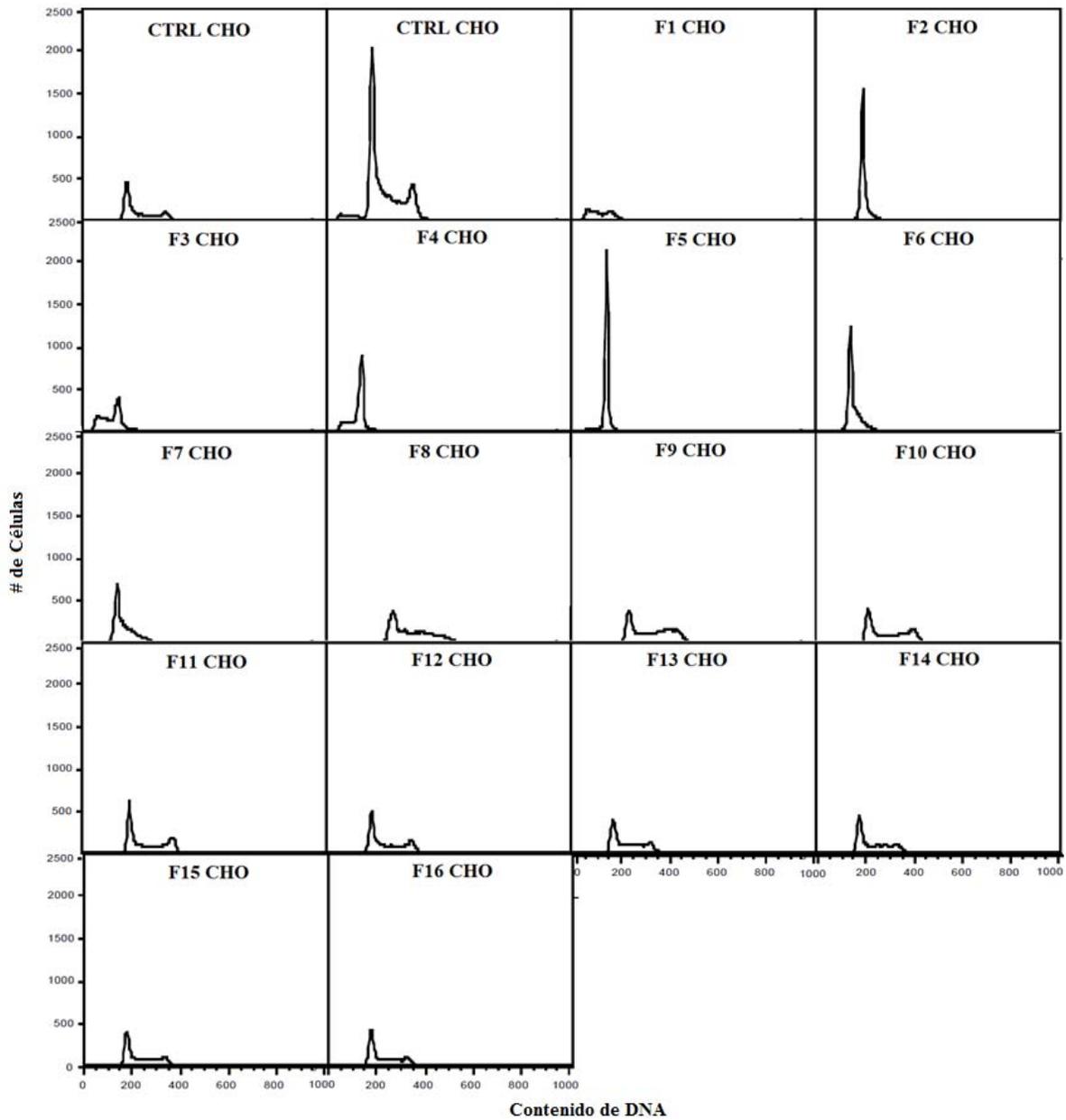


Figura 13: Contenido de DNA de poblaciones celulares de CHO DG44 obtenidas por EC.

Con la citometría de flujo se logró observar el contenido de DNA durante las fases del ciclo celular presente en células dependiendo la distribución de sus tamaños, sin embargo, para poder observar la progresión en la síntesis de DNA *in vivo* es necesario emplear células viables, ya que la cuantificación del DNA mediante tinción con Yoduro de propidio no lo permite por el hecho de emplear células fijadas. Lloyd y Al Rubeai, (2002) sugieren que para poder observar esos cambios en el contenido de DNA propios del ciclo celular es necesario realizar estudios complementarios como la determinación del contenido proteico.

Una vez identificadas las fracciones donde se obtuvieron poblaciones enriquecidas en la fase G₁ del ciclo celular se realizaron elutriaciones para coleccionar solamente dichas fracciones con la intención de cultivarlas nuevamente. Se utilizó medio de cultivo DMEM como medio de elutriación para no generar mayor estrés a las células durante el proceso de separación. Se utilizaron 3x10⁸ células para elutriar. Una vez coleccionadas las fracciones enriquecidas en G₁ se determinó el número de células por fracción y se procesó un millón de células para evaluar mediante análisis de contenido de DNA la pureza de la fracción. Se determinó el contenido de DNA en términos porcentuales empleando el software de análisis Flow Jo (TreeStar Inc.). El rendimiento por elutriación de células obtenidas en fase G₁ del ciclo celular fue del 12-15%.

En la Figura 14 se muestra el contenido de DNA de las poblaciones celulares altamente sincronizadas en la fase G₁ de ambas líneas celulares obtenidas por EC. En ambos casos se muestra el perfil de DNA de un cultivo sin elutriar (control) y debajo el perfil del contenido de DNA de una fracción celular obtenida por EC.

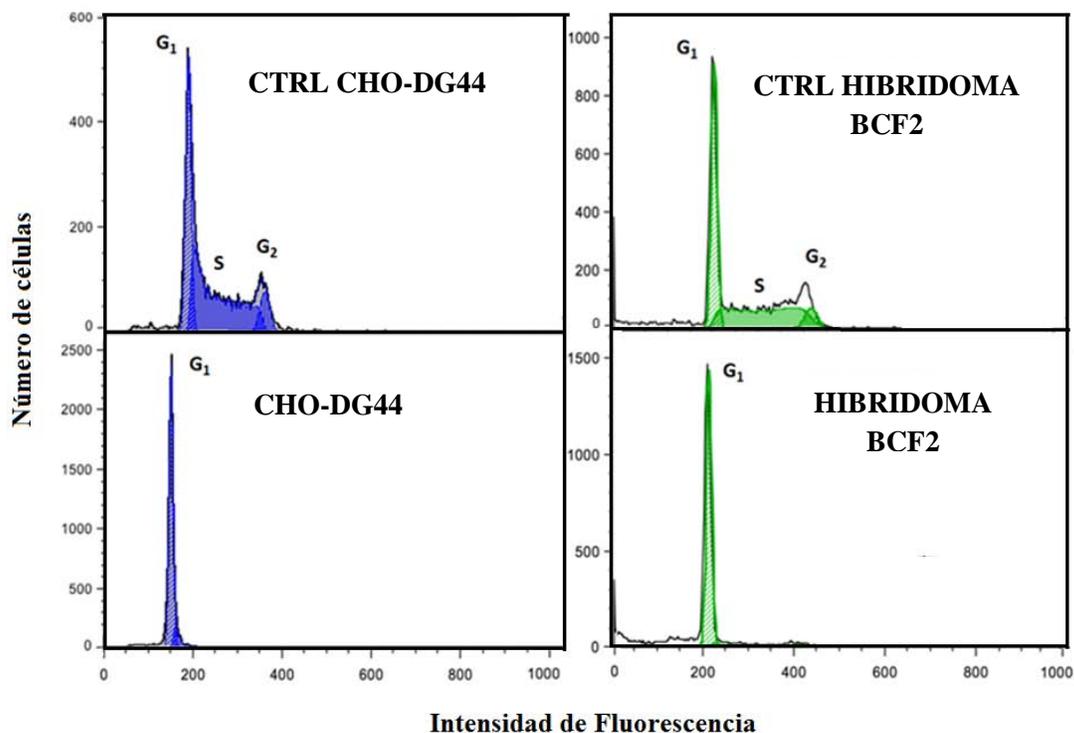


Figura 14: Contenido de DNA de subpoblaciones celulares en fase G₁ del ciclo celular de células CHO-DG44 (azul) e hibridoma murino BCF2 (verde).

En la tabla 4 se observan los porcentajes relativos de contenido de DNA de cada una de las gráficas mostradas en la figura 14. Los porcentajes de cada subpoblación celular en las diferentes fases del ciclo celular fueron calculados por el modelo computacional Dean-Jett-Fox aplicado por el software Flow Jo (TreeStar Inc.).

Tabla 4. Contenido de DNA de poblaciones heterogénea y sincronizada de células CHO DG44 e hibridoma murino BCF2.

| Subpoblación | CHO DG44 | | BCF2 | |
|------------------|----------|--------------|---------|--------------|
| | Control | F. elutriada | Control | F. elutriada |
| G ₁ % | 34.2 | 80.7 | 34.8 | 85.7 |
| S% | 53.2 | 10 | 56.9 | 9.12 |
| G ₂ % | 10 | 0.2 | 7.84 | 4.14 |

11.3 Cultivo en minibiorreactor de fracciones celulares sincronizadas de hibridoma murino BCF2.

Células de hibridoma murino BCF2 fueron separadas mediante EC y se colectaron las fracciones celulares con alta proporción de células en G₁ a las que se les cultivó en un minibiorreactor de 250 mL de volumen nominal con 30 mL de medio de cultivo CD Hibrydoma durante 48 horas. Los cultivos fueron muestreados cada 2 horas con la finalidad de observar su perfil cinético de crecimiento (figura 15) y su perfil de consumo de metabolitos glucosa, glutamina y producción de lactato (figura 16).

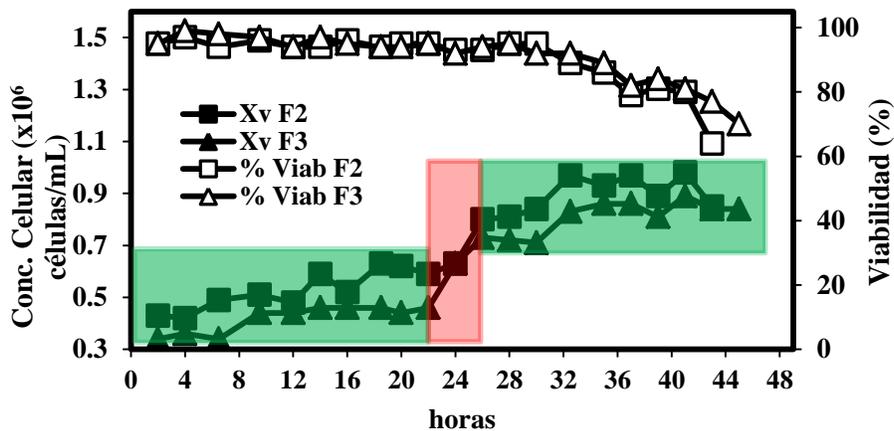


Figura 15. Concentración celular viable y viabilidad de las cinéticas de crecimiento de dos poblaciones sincronizadas de hibridoma murino BCF2 obtenidas por EC.

En la Figura 15 se observa que la progresión del crecimiento celular ocurrió de manera escalonada. En ambos cultivos se observó un primer ciclo celular donde no se verificó proliferación importante de las 0 a las 22 horas; la división celular ocurrió mayoritariamente entre las 22 y las 26 horas y finalmente el comienzo de un segundo ciclo celular a partir de las 26 horas. El incremento de células observado durante el primer ciclo del cultivo F2 así como los observados a las 8 y a las 32 horas en el cultivo F3 puede ser el resultado de que la pureza de las poblaciones cultivadas fue del 85%. Probablemente se obtuvo un perfil menos escalonado para F2 por contener mayor cantidad de células en fase G₀, las cuales

al encontrarse en condiciones favorables de cultivo comenzaron un nuevo ciclo de duplicación causando la pérdida de la sincronía de la fracción celular. Lo anterior puede ser descartado por un estudio multiparamétrico con ciclinas como la D o la E (Lloyd y Al Rubeai 2002) con el que se puede distinguir, mediante citometría de flujo, a células que se encuentran en la fase G_0 de las que se encuentran en G_1 . La constante de velocidad de crecimiento determinada para dichas poblaciones celulares durante el primer ciclo (22 horas) fue de 0.0191 h^{-1} y 0.0161 h^{-1} respectivamente, 2.3 veces menos que la de un cultivo no sincronizado en el mismo periodo de tiempo (Figura 9).

El perfil metabólico de las poblaciones sincronizadas cultivadas (Figura 16) muestran que sigue existiendo Glucosa y Glutamina en el medio a las 48 horas de cultivo, tiempo en el cual la viabilidad decayó considerablemente (Figura 15). La pérdida de viabilidad celular de los cultivos sincronizados a las 48 horas no fue atribuible a la falta de los metabolitos analizados. La pérdida de la viabilidad podría deberse a la falta de comunicación intercelular entre células en fase G_1 y células en las demás fases del ciclo celular (Turturici et al., 2014; Yoon et al., 2014) o al efecto inhibitorio que el lactato y el amonio tienen sobre el crecimiento de las líneas celulares (Glacken et al., 1985).

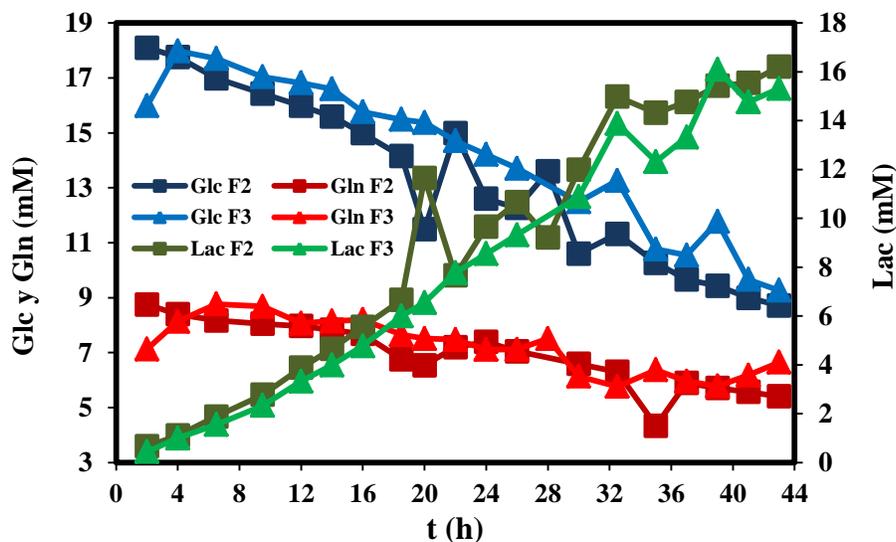


Figura 16. Perfil de metabolitos de las Cinéticas de crecimiento de dos poblaciones sincronizadas de hibridoma murino BCF2 obtenidas por EC.

Las velocidades de consumo promedio de Glucosa y Glutamina para el primer ciclo celular en ambos cultivos (primeras 22 horas) fue $0.226 \pm 0.104 \text{ } \mu\text{mol/cel} \cdot \text{h}$ y $0.108 \pm 0.029 \text{ } \mu\text{mol/cel} \cdot \text{h}$ respectivamente, mientras que la producción de Lactato tuvo una velocidad de $0.772 \pm 0.142 \text{ } \mu\text{mol/cel} \cdot \text{h}$. De acuerdo con lo evaluado previamente por Serrato et.al. (2007), solamente las velocidades de consumo de Glc y Gln son muy semejantes a las obtenidas por cultivos de hibridoma BCF2 no sincronizados cultivados en CD Hybridoma ($0.24 \pm 0.02 \text{ } \mu\text{mol/cel} \cdot \text{h}$ para Glucosa, $0.110 \pm 0.008 \text{ } \mu\text{mol/cel} \cdot \text{h}$ para Glutamina y $0.40 \pm 0.02 \text{ } \mu\text{mol/cel} \cdot \text{h}$ para Lactato). De acuerdo a lo anterior, se tienen cultivos que muestran un crecimiento escalonado pero que registran un metabolismo de Glc y Gln como el presentado por un cultivo no sincronizado. En la producción de Lactato se observaron tres pendientes, la primera durante los muestreos realizados de las 2 a las 6 horas, una segunda en los muestreos de las 6 a las 18 horas y una última de las 18 a las 22 horas que podrían ser la razón de que la velocidad de producción para un ciclo de dicho metabolito se vea aumentada casi al doble respecto a un cultivo no sincronizado. La densidad celular obtenida de células sincronizadas no nos permitió analizar de manera más amplia dicho comportamiento.

De acuerdo con Lloyd y Al-Rubeai (2002) los tiempos de duplicación varían dependiendo de la línea celular, sin embargo, en un ciclo celular promedio de 24 horas, la permanencia de las células en fase G_1 es de aproximadamente 10 horas, 9 horas en fase S, 4 horas en G_2 y 1 hora en mitosis. En la figura 15 se observó que en los cultivos sincronizados, las fases G_1 , S y G_2 en su conjunto tuvieron una duración de 22 horas y la mitosis en promedio 4 horas, valores similares a lo establecido al inicio del párrafo.

11.4 Prueba de estabilidad y Arresto químico con DMSO de CHO DG44.

11.4.1 Prueba de estabilidad del crecimiento y metabolismo de CHO DG44.

Para evaluar la estabilidad de la línea celular una vez transfectado de forma constitutiva el gen de la proteína modelo, se realizaron 25 subcultivos

consecutivos (pases) durante poco más de tres meses, partiendo de un mismo criovial. Se subcultivaron las células en medio fresco iniciando a concentraciones de 0.2×10^6 células/mL, como en la cinética mostrada en la figura 6. Se determinó la velocidad específica de crecimiento de cada pase tomando la concentración de células viables al momento de inoculación (punto inicial) y a las 144 horas de cultivo, momento en que la fase de crecimiento exponencial estuvo próxima a terminar (punto final). Se emplearon frascos T de 25 cm^2 y el medio de cultivo Cellvento-100.

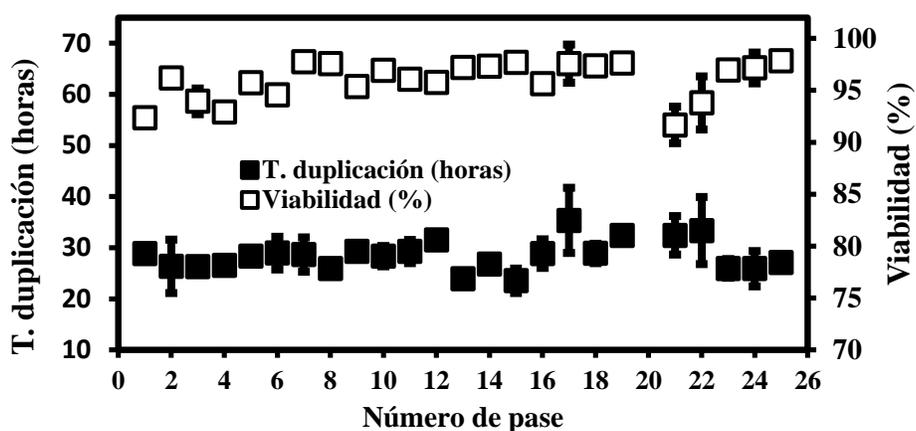


Figura 17. Prueba de estabilidad de la línea celular CHO DG44 durante 25 pases en medio de cultivo Cellvento 100. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de dos conteos independientes, cada una con dos determinaciones por punto.

En la figura 17 se muestra el comportamiento del tiempo de duplicación celular y la viabilidad de los 25 pases realizados. Para los 25 pases, la velocidad específica de crecimiento máxima promedio tuvo un valor de $0.025 \pm 0.002 \text{ horas}^{-1}$ ($t_d = 28.5 \pm 2.9$ horas) y una viabilidad del $95.97 \pm 2.09\%$. El coeficiente de variación de los tiempos de duplicación fue 10.25% y se atribuye a un control poco regulado de las condiciones de cultivo (Temperatura, humedad, $\% \text{CO}_2$) por parte de la incubadora. La desviación estándar de los datos mostrados tuvo un valor menor a 1.16 horas para el tiempo de duplicación y menor a 2.5% en la viabilidad.

La estabilidad de la línea celular CHO DG44 determinada a través de los valores de las constantes de crecimiento se comparó con las obtenidas para los cultivos

en frasco y biorreactor (véase tabla 5), mostrando el valor promedio de la velocidad específica de crecimiento (horas^{-1}) y el tiempo de duplicación (horas) para cada condición en que fue determinada.

Tabla 5. Comparación de las velocidades específicas de crecimiento para CHO DG44.

| Condición | μ (h^{-1})* | t_d (h)* |
|--------------|----------------------------|----------------|
| CHO Frasco | 0.025 ± 0.003 | 28.5 ± 4.4 |
| CHO Reactor | 0.026 ± 0.002 | 29.6 ± 2.9 |
| CHO 25 pases | 0.025 ± 0.002 | 28.5 ± 2.9 |

*Valores expresados en Promedio \pm Desviación Estándar.

Los componentes químicos de los medios de cultivo definen el comportamiento cinético de una línea celular, su producción y la calidad de las proteínas secretadas (Serrato et al., 2007). A pesar de emplear líneas celulares del mismo origen, Ahn y Antoniewicz (2011) reportaron que células CHO K1 cultivadas en medio DMEM con SFB presentaron una μ de 0.033 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 21 hrs, valores distintos de lo obtenido en el presente trabajo (tabla 5) a causa del suero fetal bovino.

En la figura 18 se muestran las concentraciones finales de Glucosa, Glutamina y Lactato medidos en el medio.

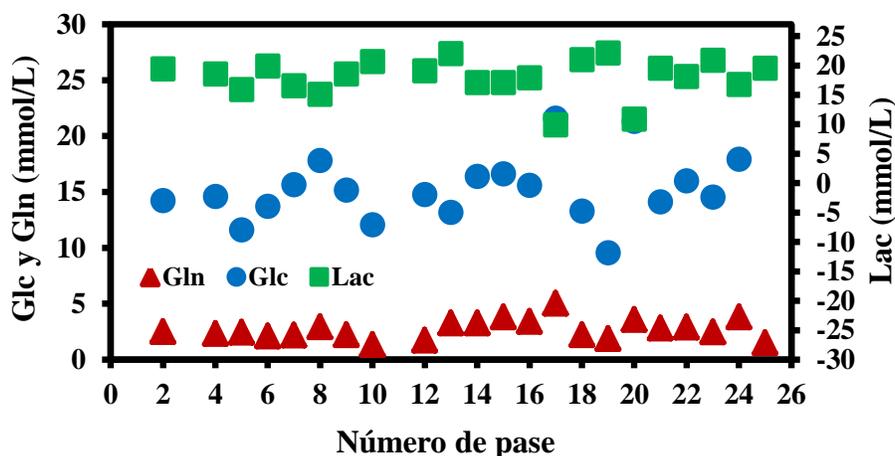


Figura 18. Perfil final de metabolitos durante 25 pases consecutivos.

El medio de cultivo Cellvento 100 inicialmente tiene una concentración de 36 mM de Glc y 6 mM de Gln. La concentración de los metabolitos medidos al final de cada pase presentó valores promedio de 18.01 ± 3.11 mM para Lac, 15.22 ± 2.87 mM para Glc y 2.65 ± 0.99 mM para Gln. Es evidente que no hubo un agotamiento de las fuentes de carbono y energía (Glc y Gln), sin embargo se observa que la concentración de Gln casi es nula y esto da pie a pensar que el agotamiento de la principal fuente de nitrógeno para formar las bases nitrogenadas empleadas en la duplicación celular sea la razón por la cual las células comienzan a morir si no son subcultivadas en medio fresco (Häggström, 2003).

Las velocidades de consumo de Glc y Gln promedio de los 25 pases fueron 0.24 ± 0.04 pmol/cel*h y 0.04 ± 0.01 pmol/cel*h respectivamente, mientras que la velocidad de producción de Lac fue 0.15 ± 0.03 pmol/cel*h. Éstos resultados son comparables a los obtenidos en las cinéticas de crecimiento típico (figura 8) para el caso de Glutamina y Lactato, sin embargo, para la Glucosa la velocidad promedio de consumo de glucosa resultó ser del doble de valor debido a que se tiene mayor cantidad inicial de Glucosa en el cultivo (35 mM de Glc en Cellvento 100 y 24 mM de Glc en CD OptiCHO).

11.4.2 Arresto celular de CHO DG44 con DMSO

Se estudió el comportamiento cinético de la línea celular frente al Dimetil Sulfoxido (DMSO) empleado como agente químico de arresto celular a diferentes concentraciones (v/v) en el medio de cultivo. Se determinaron los perfiles de crecimiento obtenidos para cada concentración evaluada (Figura 19) y se tomaron muestras de caldo de cultivo para determinar si el consumo de Glc, Gln y la producción de Lac presentaron alteraciones con respecto al control (Figura 8) por la presencia del agente químico en el cultivo (Figura 20).

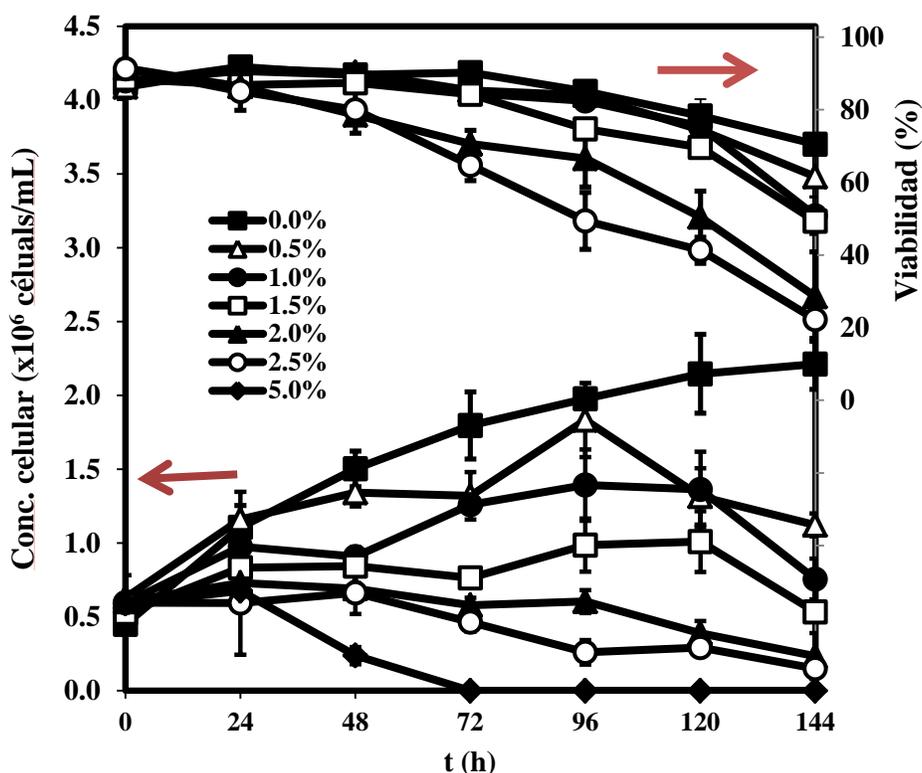


Figura 19. Arresto químico de células CHO DG44 a diferentes concentraciones (v/v) de DMSO.

Se observó que la concentración celular máxima alcanzada en todos los cultivos en presencia de DMSO fue menor a la alcanzada en ausencia de éste (0.0% DMSO). Lo anterior se hizo evidente desde el cultivo con DMSO al 0.5%, que fue la concentración empleada más baja. A las concentraciones 1.0% y 1.5% se observó arresto celular con afectaciones mínimas a la viabilidad, sin embargo, en el cultivo con DMSO al 1.5% el efecto fue más consistente de las 24 a las 120 horas de cultivo. El efecto negativo concentración-dependiente (tóxico) del agente de arresto se hizo evidente en los cultivos con DMSO al 2.0%, 2.5% y 5.0% en donde se observa una disminución drástica de la viabilidad y concentración celular a partir de las 48 horas. Al comparar los resultados obtenidos en los cultivos a 1.5% y el control (0.0%) se observó que a las 24 horas en presencia de DMSO al 1.5% ya se habían arrestado las células siendo que al inicio ambos tenían una concentración celular de 0.6×10^6 cel/mL y una viabilidad del 90%. Dicho arresto se

prolongó hasta las 120 horas de cultivo. El arresto celular es más evidente si se considera que a las 72 horas, el cultivo control tuvo una concentración celular de 1.8×10^6 cel/mL y una viabilidad del 85.3%, mientras que para las células en presencia de DMSO fue 0.77×10^6 cel/mL con una viabilidad de 84.3%, significando una reducción del 60% en la concentración celular viable por el efecto del DMSO. Las células CHO DG44 en presencia constante de DMSO a una concentración de 1.5% v/v permanecieron arrestadas pero viables durante 120 horas con un único incremento considerable en la proliferación celular (0.2×10^6 cel/mL) durante las primeras 24 horas de exposición al agente químico.

Fiore et.al. (2002) evaluaron el efecto de las concentraciones 1%, 1.5% y 2% de DMSO en células CHO-K1. Sus resultados fueron similares a los obtenidos en el presente estudio con respecto al arresto y la viabilidad celular, sin embargo, el tiempo de exposición al DMSO que ellos evaluaron fue de 96 horas. Los autores no observaron efectos citotóxicos o genotóxicos en las células después de la recuperación de dichas células en medio sin DMSO, sin embargo, no determinaron si existieron alteraciones en la estructura o actividad de proteínas secretadas. Existen evidencias que muestran que el DMSO aumenta la transcripción de mRNA aunque no necesariamente la expresión de proteínas (Wang et al., 2012).

Se ha reportado que algunos de los efectos del DMSO involucrados en la detención del ciclo celular tienen que ver con la inhibición de la expresión de *c-myc* durante la transición de G1 a S, (Srnivas et al., 1991). En la mitocondria, se ha reportado que causa el colapso del potencial de la membrana mitocondrial liberando citocromo C de la mitocondria y activando a las caspasas 9 y 3 de la vía apoptótica, lo cual podría explicar la muerte celular y la baja viabilidad observada en los cultivos con concentraciones mayores a 1.5% de DMSO (Lui et.al., 2001).

En la figura 20 se muestran los cambios en el perfil de consumo de Glucosa, Glutamina y de producción de Lactato. Se observó que el consumo de Glucosa y Glutamina en el cultivo control (azul) y en los cultivos con DMSO 0.5%, 1.0% y

1.5% son comparables durante todo el tiempo de cultivo. A las 72 horas fue más evidente la diferencia entre los perfiles de consumo y producción de las células en presencia de DMSO al 2.0%, 2.5% y 5.0% y el control (0.0%). A las 72 horas la población celular de los cultivos con DMSO en concentración mayor a 1.5 % es menos de la mitad de la población en el cultivo control mientras que a la concentración de 5.0% la población celular es prácticamente cero.

A diferencia de lo que ocurrió con Glc y Gln, la producción de Lac mostró diferencias más acentuadas para los cultivos con más de 1.0% de DMSO que podría ser el resultado de la disminución en la actividad de enzimas involucradas en la glucólisis (Aldolasa, trifosfato isomerasa, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato cinasa) a causa del DMSO (Li et al., 2006). Al haber menor producción de piruvato, éste es metabolizado más eficientemente y pasa al ciclo de Krebs sin dar pie a la formación de lactato.

En los perfiles de producción de lactato de los cultivos con DMSO a 2.0% y 2.5% se observó una disminución en la concentración final del metabolito a partir de las 72 horas. Beamer et al. (2006) observaron el mismo efecto y explicaron dicho fenómeno por un aumento en la oxidación del lactato a piruvato y una disminución de la reducción piruvato a lactato gracias a la lactato deshidrogenasa a causa del DMSO en el medio de cultivo, la falta de equilibrio en la reacción es desencadenada por una condensación aldólica entre el DMSO con el piruvato.

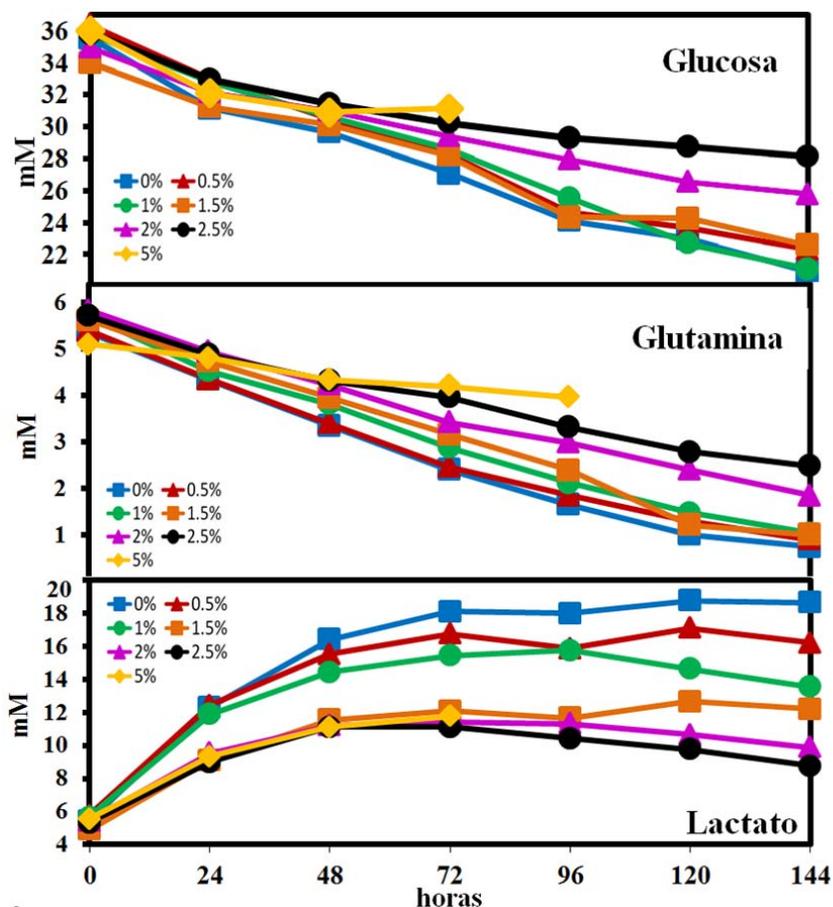


Figura 20. Perfil metabólico de CHO a diferentes concentraciones de DMSO v/v.

Es sabido que un modo de internalización de moléculas relacionadas con la formación de ATP ocurre por receptores acoplados a bombas de iones situadas en la membrana mitocondrial (de Lores and Ordieres, 2014) y se ha reportado que el DMSO penetra la membrana celular y causa alteraciones en la osmolaridad intracelular que modifican el mecanismo de transporte de iones como K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , resultando en afectaciones a la viabilidad celular. (Santos et al., 2003).

Häggröm (2003) comentó que los cambios en los perfiles metabólicos por si solos no son base suficiente para afirmar concluyentemente que existen alteraciones en alguna ruta metabólica, sin embargo, si pueden ser empleados para reconocer cambios en el metabolismo.

En la Figura 21 se muestran las velocidades de consumo y producción de cada metabolito a diferentes concentraciones de DMSO hasta las 48 horas de cultivo,

tiempo en el que la viabilidad de la mayoría de los cultivos se encontraba por arriba del 80%. No se consideró al cultivo con DMSO al 5.0% debido a que la viabilidad celular fue de 26% a las 48 horas y 0% a las 72 horas, por lo que el valor de la velocidad de consumo/producción justificaría más la falta de células viables y no el verdadero consumo de los metabolitos.

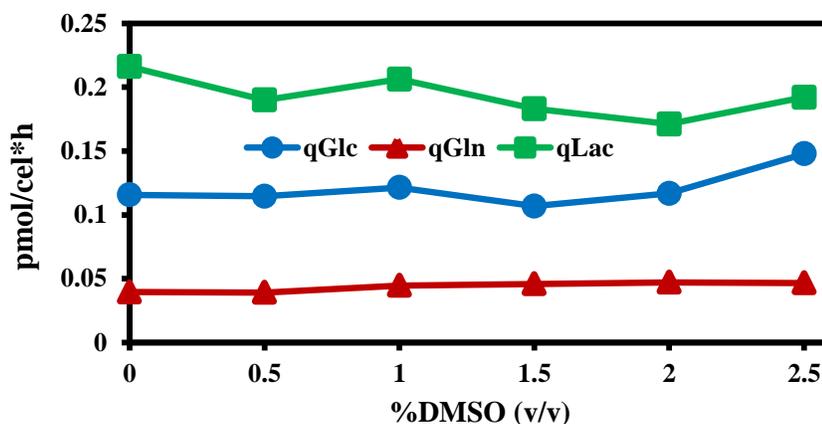


Figura 21. Velocidad específica de consumo de Glc y Gln, y producción de Lac de CHO DG44 en presencia de diferentes concentraciones de DMSO.

Los órdenes de magnitud de las velocidades de consumo y producción (Véase tabla 6) son similares a los obtenidos para el cultivo donde no existe arresto químico (Véase Figura 8). Dichos valores son también del orden de magnitud de los reportados por Ahn y Antoniewicz (2011) para un cultivo de células CHO K1 en medio DMEM sin DMSO (qGlc de 0.201 pmol/cel*h, qGln de 0.036 pmol/cel*h y qLac de 0.299 pmol/cel*h). Se observó que a medida que aumentó la concentración de DMSO en el medio de cultivo lo hizo también la velocidad de consumo de glucosa pero no la de lactato, cuya velocidad de producción mostró una tendencia a disminuir.

La velocidad específica de consumo de glutamina no mostró alteraciones significativas en cultivos con DMSO a concentraciones menores de 2.5% aunque se observó una tendencia a incrementar.

Niklas et al. (2009) encontraron que en células Hep G2 (células cancerosas de tejido hepático humano) el DMSO también afectó el crecimiento y metabolismo

celular, observando que a concentraciones mayores de 0.5% y 1.0% de DMSO el consumo de Gln y Glc disminuye respectivamente, pero no así la producción de Lac, que aumenta a la par de los incrementos en la concentración de DMSO a diferencia de lo reportado en éste trabajo.

Tabla 6. Velocidad específica de consumo de Glc y Gln, y producción de Lac de CHO DG44 en presencia de diferentes concentraciones de DMSO.

| % DMSO | q Glc (pmol/cel*h) | q Gln (pmol/cel*h) | q Lac (pmol/cel*h) |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0.0 | 0.116 | 0.040 | 0.216 |
| 0.5 | 0.115 | 0.039 | 0.190 |
| 1.0 | 0.121 | 0.045 | 0.206 |
| 1.5 | 0.107 | 0.046 | 0.183 |
| 2.0 | 0.117 | 0.047 | 0.171 |
| 2.5 | 0.148 | 0.047 | 0.192 |

Con lo anterior se muestra que el DMSO tiene un efecto en el crecimiento y metabolismo celular de líneas celulares de mamífero dependiendo del tipo de línea celular y las concentraciones empleadas. Para el uso de células CHO DG44 en investigación sobre el arresto del ciclo celular se sugieren concentraciones menores a 1.5% de DMSO.

Durante los experimentos sobre el efecto del DMSO en células CHO DG44 se observó un incremento en la adherencia de las células a los frascos de trabajo, efecto que también ha sido reportado previamente por Fiore y Degrossi, (1999) al trabajar con DMSO y células CHO KI.

12 Conclusiones.

- Las poblaciones celulares sincronizadas de hibridoma murino BCF2 mostraron un perfil de crecimiento escalonado durante 48 horas con una constante de la velocidad de crecimiento promedio de 0.0176 h^{-1} para el primer ciclo de duplicación, es decir, 2.3 veces menor que la mostrada por un cultivo de células no sincronizadas (0.0401 h^{-1}).
- El perfil metabólico de consumo de Glucosa y Glutamina de los cultivos sincronizados de hibridomas murinos BCF2 fue similar al de un cultivo no sincronizado.
- La separación de subpoblaciones celulares en G_1 del ciclo celular de hibridoma murino BCF2 por EC permitió obtener un cultivo con un perfil de crecimiento escalonado sin mostrar alteraciones metabólicas evidentes en el consumo de Glucosa y Glutamina respecto a un cultivo no sincronizado.
- Durante el primer ciclo de duplicación del cultivo sincronizado de hibridomas murino BCF2 se observaron dos pendientes en la velocidad de producción de Lactato correspondientes a las fases G_1 y S del ciclo celular, que probablemente se deban a los incrementos en la concentración celular registrados en dichas fases.
- La alta adherencia entre células CHO DG44 no permitió la obtención de perfiles de elutriación definidas pero si la obtención de poblaciones con alta pureza de células en fase G_1 del ciclo celular.
- El cultivo de la línea celular CHO-DG44 en frasco T, Biorreactor y durante un cultivo ininterrumpido de 25 pases tuvieron una constante de velocidad específica de crecimiento de $0.025 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$, por lo que la línea celular es estable y puede ser empleada en procesos que involucran largos periodos de tiempo.
- El DMSO tuvo un efecto negativo concentración-dependiente en el crecimiento celular de CHO DG44 y un incremento en el metabolismo de Glucosa y Lactato. DMSO al 1.5% v/v representó la concentración óptima

para arrestar a las células sin comprometer la viabilidad. Se desconoce el efecto en la producción de proteínas.

13 Perspectivas

- Mejorar la pureza de las poblaciones obtenidas en la fase G1 del ciclo celular.
- Incrementar la concentración de células sincronizadas para determinar si existen cambios en los perfiles metabólicos en las diferentes fases del ciclo celular.
- Obtener poblaciones celulares sincronizadas de células CHO DG44.
- Ampliar el estudio de arresto celular con DMSO a 1.5% para determinar el impacto en la producción de alguna proteína recombinante.

14 Figuras Anexadas

14.1 Constantes de velocidad de crecimiento celular CHO DG44

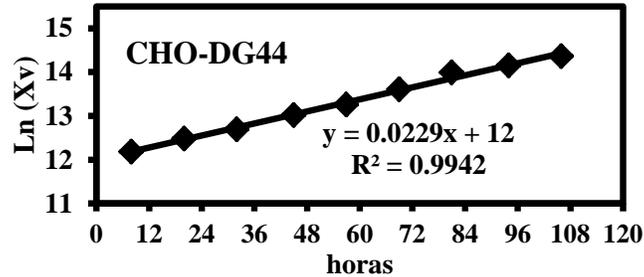


Figura A 1. Regresión lineal primera cinética CHO DG44 en frasco T.

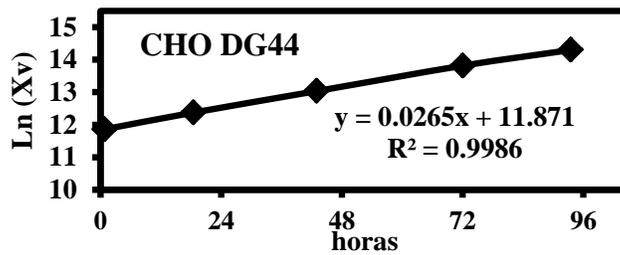


Figura A 2. Regresión lineal segunda cinética CHO DG44 en frasco T.

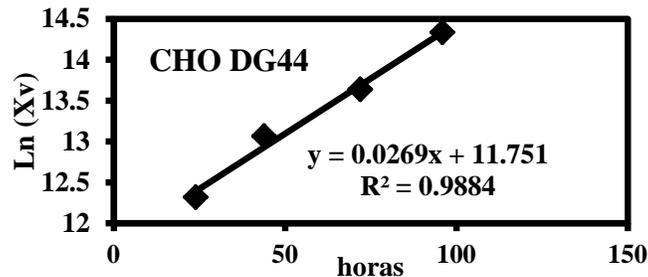


Figura A 3. Regresión lineal primer cinética CHO DG44 en minibioreactor.

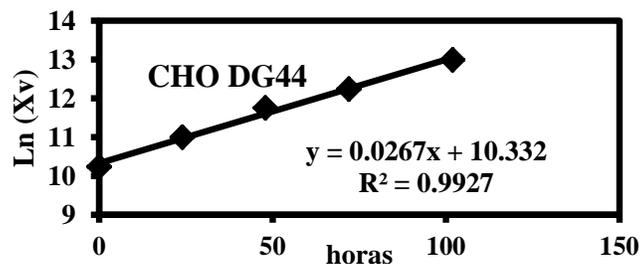


Figura A 4. Regresión lineal segunda cinética CHO DG44 en minibioreactor.

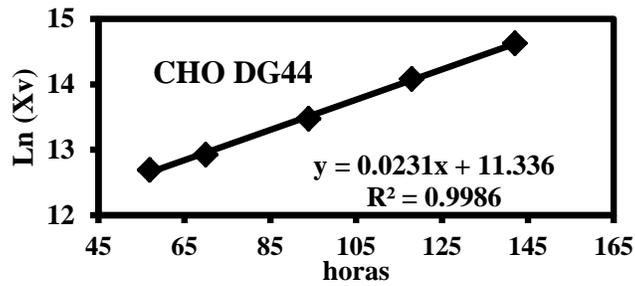


Figura A 5. Regresión lineal tercera cinética CHO DG44 en minibioreactor.

14.2 Cinéticas de crecimiento celular de CHO DG44 en presencia de DMSO a diferentes concentraciones

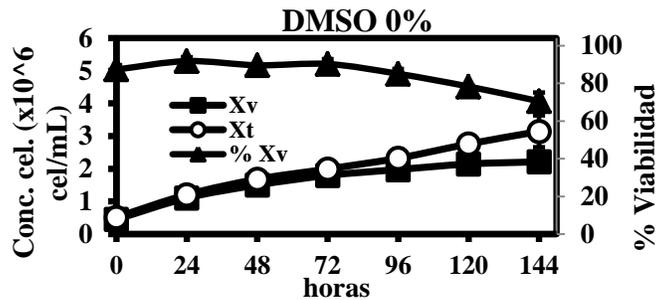


Figura A 6. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 0.0% v/v.

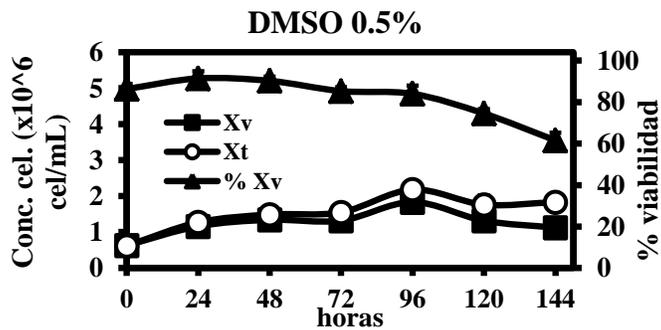


Figura A 7. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 0.5% v/v.

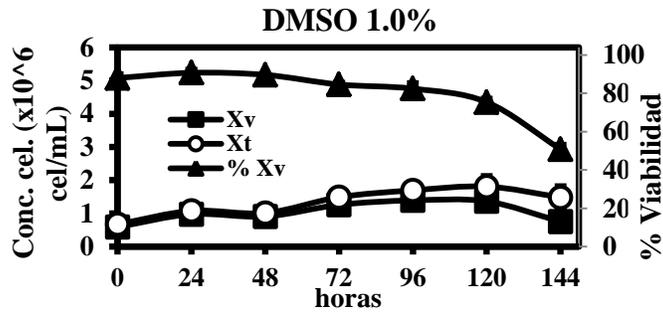


Figura A 8. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 1.0% v/v.

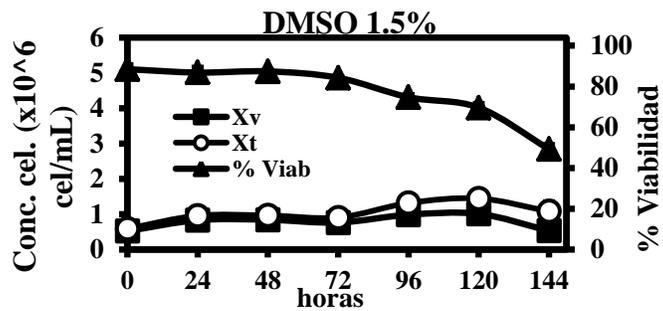


Figura A 9. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 1.5% v/v.

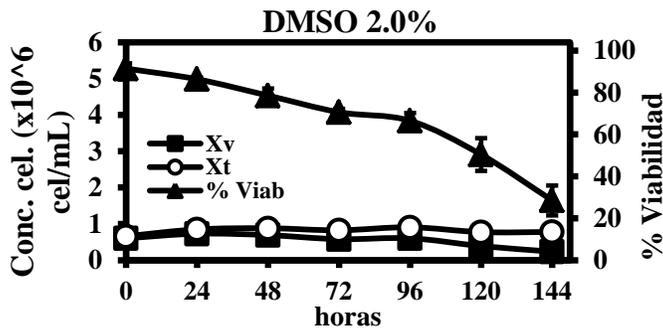


Figura A 10. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 2.0% v/v.

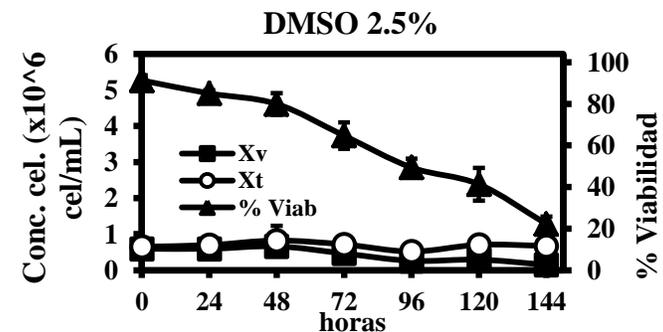


Figura A 11. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 2.5% v/v.

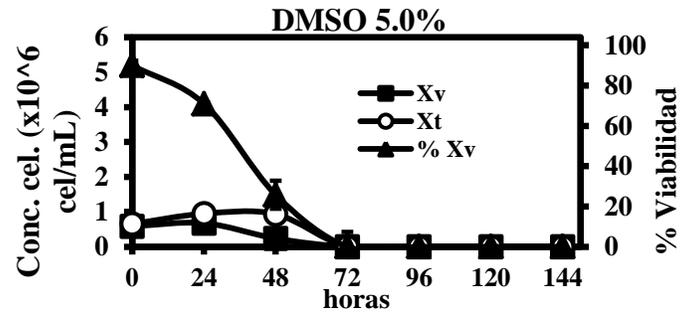


Figura A 12. Concentración y viabilidad celular CHO DG44 con DMSO 5.0% v/v.

15. Referencias

- Ahn W.** and Antoniewicz M. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering* **13**: 598-609.
- Al-Rubeai M.**, Emery A. and Chalder S. (1991) Flow cytometric study of cultured mammalian cells. *Journal of Biotechnology* **19**:67-82.
- Amand M.**, Oqunnaïke B. and Robinson A. (2014). Development of at-line assay to monitor charge variants of MAbs during production. *Biotechnology Progress* **30**:249-255.
- Aten J.**, Bakker P., Stap J., Boschman G. And Veenhof C. (1992). DNA double labelling with IdUrd and CidUrd for spatial and temporal analysis of cell proliferation and DNA replication. *Histochem Journal*.**5**: 251-259.
- Banfalvi G.** (2008). Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nature Protocols* **3**:663-673.
- Barnes L.** Bentley C and Dickson A. (2002). Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* **81**:631-639.
- Beamer R.**, Wynn J., Rollins J. And Ledesma R. (2006). Biochemical interactions of dimethyl sulfoxide II: Lactate dehydrogenase-catalyzed reactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **62**: 1384-1386
- Bi J.**, Shuttleworth J and 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.
- Bollati-Fogolin M.**, Forno G., Nimtz M., Conradt H., Etcheverrigaray M. and Kratje R. (2005). Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: effect on productivity and product quality. *Biotechnology Progress* **21**:17-21.

- Boye E.**, Stokke T., Kleckner N., and Skarstad K. (1996). Coordinating DNA replication initiation with cell growth: Differential roles for DnaA and SeqA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:12206-12211.
- Butler M.** (2006). Optimization of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology* **50**: 57-76.
- Carvalho A.**, Marcelino I. and Carrondo M. (2003). Metabolic changes during cell growth inhibition by p27 overexpression. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**:164-173.
- Chusainow J.**, Sheng Y., Yeo J., Choo P., Asvadi P., Wong N. and Yap M. (2009). A Study of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell lines: What Makes a Stable High Producer? *Biotechnology and Bioengineering* **102**:1182-1196.
- Clark K.**, Chaplin F. and Harcum S. (2004). Temperature effects on product-quality-related enzymes in batch CHO cell cultures producing recombinant tPA. *Biotechnology Progress* **20**:1888-1892.
- Cooper S.** (2003). Rethinking synchronization of mammalian cells for cell cycle analysis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**:1099-1106.
- Coulais D.**, Panterne C., Fonteneau J. and Grégoire M. (2012). Purification of circulating plasmacytoid dendritic cells using counterflow centrifugal elutriation and immunomagnetic beads. *Cytotherapy* **14**:887-896.
- Cowan N.** and Milstein C. (1972). Automatic monitoring of biochemical parameters in tissue culture. Studies on synchronously growing mouse myeloma cells. *Biochemical Journal* **128**:445-454.
- Darzynkiewicz Z.**, Gong J., Juan G., Ardel B and Traganos F. (1996). Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* **25**:1-13.

- De Lores G.** and Ordieres M. (2014). Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity in Aging and Disease. *International Journal of Biomedical Science*.**10**:85-102.
- Duttom R.** and Scharer J. (2007). Cell cycle phase dependent productivity of a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology* **52**:55-69.
- Fiore M.** and Degrassi F. (1999). Dimethyl sulfoxide restores contact inhibition-induced growth arrest and inhibits cell density-dependent apoptosis in hamster cells. *Experimental Cell Research* **251**:102-110.
- Fiore M.,** Zanier R. and Degrassi F. (2002). Reversible G1 arrest by dimethyl sulfoxide as a new method to synchronize Chinese Hamster cells. *Mutagenesis* **17**:419-424.
- Glacken M.,** Fleischaker R. And Sinskey A. (1985). Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* **28**:1376-1389.
- Gódia F.** and Cairó J. (2006). Cell Metabolism. In: Ozturk S. and Hu W. (eds) *Cell Culture Technology for pharmaceutical and cell-based therapies*, CRC Press, Boca Raton, Fl. 81-112.
- Grosse J.,** Meier K., Bauer T., Eilles C. and Grimm D. (2012). Cell Separation by countercurrent centrifugal elutriation: Recent developments. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* **42**:217-233.
- Hayles J.,** Fisher D., Woollard A. and Nurse P. (1994). Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the stat of the p34cdc2 mitotic B cyclin complex. *Cell* **78**: 813-822.
- Hägström L.** (2003). Cell Metabolism, Animal. En: *Encyclopedia of Cell Technology*. Royal Institute of Technology. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Stockholm, Sweden. 392-411.

- Hendrick V.**, Winnepenninckx P., Abdelkafi C., Vandeputte O., Cherlet M., Marique T., Renemann G., Loa A., Kretzmer G. and Werenne J. (2001). Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology* **36**:71-83.
- Kim J.**, Kim Y. and Lee G. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**:917-930.
- Kromenaker S.** and Sriene F. (1991). Cell cycle-dependent protein accumulation by producer and non producer murine hybridoma cell lines: a population analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **38**:665-677.
- Kumar N.**, Gammel P. and Clynes M. (2007). Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology* **53**:33-46.
- Lacadena J.** (1996) Citogenética. Primera Edición. Ed. Complutense. Madrid, España.
- Lai T.**, Yang Y. and Kong S. (2013). Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals* **6**:579-603.
- Li F.**, Vijayasankaran N., Shen A., Kiss R. and Amanullah A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *Landes Bioscience mAbs* **2**:466-477.
- Li J.**, Huang Z., Sun X., Yang P. And Zhang Y. (2006). Understanding the enhanced effect of dimethyl sulfoxide on hepatitis B surface antigen expression in the culture of Chinese hamster ovary cells on the basis of proteome analysis. *Enzyme and Microbial Technology* **38**:372-380.
- Li Z.** and Srivastava P. (2004). Heat-shock proteins. Current Protocols in Immunology. Appendix 1:Appendix 1T. doi:10.1002/0471142735.ima01ts58.

- Lim Y.**, Wong N., Lee Y., Ku S., Wong D. and Yap M. (2010). Engineering mammalian cells in bioprocessing-current achievements and future perspectives. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **55**:175-189.
- Lindahl P.** (1948). Principle of a counter-streaming centrifuge for the separation of particles of different sizes. *Nature* **161**: 648.
- Lloyd D.**, Leelavatcharamas V., Emery A. and Al-Rubeai M. (1999). The role of the cycle in determining gene expression and productivity in CHO cells. *Cytotechnology* **30**:49-57.
- Lloyd D.** and Al-Rubeai M. (2002). Cell Cycle. En: *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Birmingham, Inglaterra. 465-559.
- Lohr V.**, Hädicke O., Genzel Y., Jordan I., Büntemeyer H., Klamt S. And Reichi U. (2014). The avian cell line AGE1.CR.pIX characterized by metabolic flux analysis. *BMC Biotechnology* **72**:1-14.
- Lui J.**, Yoshikawa H., Nakajima Y. and Tasaka K. (2001). Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase 9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. *International Immunopharmacology* **1**: 63-74.
- Ishidate T.**, Elewa A., Kim S., Mello C. And Shirayama M. (2014). Divide and differentiate: CDK/Cyclins and the art of development. *Cell Cycle* **13**: 1389-1391.
- Matherly L.**, Schuetz J., Westin E. and Goldman I. (1989). A method for the synchronization of cultured cells with aphidicolin: Application to the large-scale synchronization of L1210 cells and the study of the cell cycle regulation of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase. *Analytical Biochemistry* **182**:338-345.
- Matsushime H.**, Ewen M., Strom D., Kato J., Hanks S., Roussel M. and Sherr C. (1992). Identification and Properties of an Atypical Catalytic Subunit (p34^{PSK-J3}/cdk4) for Mammalian D Type G1 Cyclins. *Cell* **71**:323-334.

- Mullard A.** (2012). Can next-generation antibodies offset biosimilar competition? *Nature Reviews Drug Discovery* **11**:426-428.
- Müller-Esterl W.** (2008). Gluconeogénesis y Ciclo de Cori. En: *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Ed. Reverté. Barcelona, España. 533 y 534.
- Nelson A.,** Dhimolea E. and Reichert J. (2010). Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature reviews, Drug discovery* **9**:767-774.
- Neermann J.** and Wagner R. (1996). Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *Journal of cellular physiology* **166**: 152-169.
- Niklas J.,** Noor F. and Heinzle E. (2009). Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line Hep G2. *Toxicology and Applied Pharmacology* **240**: 327-336.
- Nurse P.** (1994): Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**:547-550.
- Ohsaka Y.,** Ohgiya S., Hoschino T. and Ishizaki K. (2002). Phosphorilation of c-Jun N-terminal kinase in human hepatoblastoma cells is transiently increased by cold exposure and further enhanced by subsequent warm incubation of the cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* **12**:111-118.
- Ponzio G.,** Loubat A., Rochet N., Turchi L., Rezzonico R., Farahi D., Dulic V. and Rossi B. (1998). Early G(1) growth arrest of hibridoma B cells by DMSO involves cyclin D2 inhibition and p21 (CIP1) induction. *Oncogene* **17**:1159-1166.
- Pritchard D.** and Korl B. (2013). *Medical Genetics at a Glance*. Third Edition. Ed. Wiley-Black Well. Oxford, Inglaterra.
- Quon K.,** Marczyński G. and Shapiro L. (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**:83-93.

- Rosas R.** (2013). La elutriación como un método de sincronización de células animales en las diferentes fases del ciclo celular. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santos N.,** Figueira-Coelho J., Martins-Silva J. and Saldanha C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology* **65**:1035-1041.
- Sawai M.,** Takase K., Teraoka H. and Tsudaka K. (1990). Reversible G1 arrest in the cell cycle of human Lymphoid cell lines by Dimethyl Sulfoxide. *Experimental Cell Research* **187**:4-10.
- Serrato J.,** Hernández V., Estrada-Mondaca S., Palomares L. and Ramírez O. (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.
- Sherr C.** (1993). Mammalian G1 Cyclins. *Cell* **73**:1059-1065.
- Srinivas S.,** Sironmani T. and Shanmugam G. (1991). Dimethyl sulfoxide inhibits the expression of early growth-response genes and arrest fibroblast at quiescence. *Experimental Cell Research* **196**: 279-286.
- Takase K.,** Sawai M., Yamamoto K., Yata J., Takasaki Y., Teroaka H. and Tsukada K. (1992). Reversible G1 Arrest Induced by Dimethyl Sulfoxide in Human Lymphoid Cell Lines: Kinetics of the Arrest and Expression of the Cell Cycle Marker Proliferating Cell Nuclear Antigen in Raji Cells. *Cell Growth and Differentiation* **3**:515-521.
- Turturici G.,** Tinnirello R., Sconzo G. and Geraci F. (2014). Extracelullar membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication:advantages and disadvantages. *American Journal of Physiology* **306**:621-633.
- Trummer E.,** Fauland K., Seidinger S., Schriebl K., Lattenmayer C., Kunert R., Vorauer-Uhl K., Weik R., Borth N., Katinger H. and Müller D. (2006). Process

parameter shifting: Biphasic cultivation- A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering* **94**:1045-1052.

Vindelov L. and Christens I. (1994). Detergent and Proteolytic Enzyme-Based Techniques for Nuclear Isolation and DNA Content Analysis. *Methods in Cell Biology* **41**:219-229.

Voet D., Voet J. and Pratt C. (2009). Glucose Catabolism. En: *Fundamentals of Biochemistry. Second Edition*. Ed. Panamericana. Madrid, España. 428-471.

Wang C., Lin S., Lai Y., Liu Y., Hsu Y. and Chen J. (2012). Dimethyl Sulfoxide Promotes the Multiple Functions of the Tumor Suppressor HLJ1 through Activator Protein-1 Activation in NSCLC Cells. *PLoS One* **7**:1-10.

Wang X., He S., Zhang Y., Xu J., Feng Q., Li L., Mi L. and Chen Z. (2004). DMSO arrested hybridoma cells for enhanced antibody production. *Chinese Journal of Biotechnology* **20**:568-571.

Winzeler A. and Wang J. (2013). Culturing hybridoma cell lines for monoclonal antibody production. *Cold Spring Harbor Protocols* **7**:640-642.

Wurm F. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Natural Biotechnology* **22**:1393-1398.

Xie L. and Zhou W. (2006). Fed-Batch Cultivation of Mammalian Cells for the Production of Recombinant Proteins. In: Ozturk S. and Hu W. (eds) *Cell Culture Technology for pharmaceutical and cell-based therapies*, CRC Press, Boca Raton, Fl. 349-386.

Yoon S., Song J. and Lee G. (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering* **82**:289-298.

Yoon Y. Kim O. and Gho Y. (2014). Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes. *BMB Reports*. Publication in progress.

Zamudio F., Saavedra R., Martin B., Gurrola-Briones G., Hérion P. and Possani L. (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.