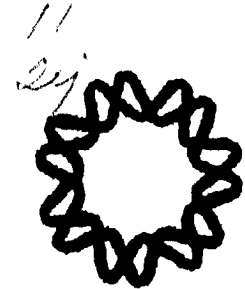




Universidad Nacional Autónoma  
de México

Instituto de Biotecnología

03072



**Caracterización cinética y metabólica de  
cultivos de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9): Hacia  
el desarrollo de estrategias de control**

**T E S I S**

que para obtener el grado de

**Maestra en Biotecnología**

**Presenta**

**Ing. Laura Alicia Palomares Aguilera**

**Cuernavaca, Morelos**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN-506594 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 85797.

A Roberto,

Gracias por tu paciencia y apoyo

A mis padres

Alicia y Jaime

Gracias por hacerme lo que soy y por su apoyo incondicional

A mis hermanas,

Ivett, Ana Francis y Lizett María

Gracias por sus porras

A mis abuelos,

Consuelo<sup>†</sup> y Ramón<sup>†</sup>

Alicia y Jesús

Los amo

A todos los Palomares y Aguilera.

A mis amigos,

**Laura Elena, Lizbeth, Francis, Adriana, las vřboras, Victor, Gerardo y Pola,  
Gustavo, Antonio (el Leoncito), y todos los demás.**

## **Agradecimientos**

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, quien ha sido una importante guía en mi desarrollo profesional.

A los miembros del jurado, por sus valiosos comentarios:

Dr. Carlos Federico Arias Ortíz

Dr. Gustavo Viniegra González

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich

Dr. Enrique Galindo Fentanes

Dra. Alejandra Bravo de la Parra

A la Lic. Karin Levy, la Ing. Esther Escarzaga, la Tec. Maribel Flores y el M.C. Timoteo Olamendi por su participación en el presente trabajo.

A mis compañeros y amigos del grupo OTR/EG, especialmente a Ana Edith, Antonio, Francisco y Ronaldo, por su ayuda y comentarios.

**A todos los demás que participaron en este trabajo, especialmente a la familia Ramírez Aguilera.**

# Indice

Indice de Figuras	iv
Indice de Tablas	viii
Nomenclatura	x
Resumen	1
Capítulo 1 Introducción	3
Capítulo 2 Antecedentes	5
2.1 El sistema células de insecto/baculovirus	5
2.2 Técnicas de cultivo de células de insecto	5
2.2.1 Fragilidad celular	7
2.2.2 Transferencia de masa insuficiente	8
2.2.3 Toxicidad de metabolitos	9
2.2.4 Requerimientos nutricionales complejos	12
2.3 Estrategias utilizadas para mejorar el cultivo <i>in vitro</i>	18
Capítulo 3 Objetivos	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos específicos	21
Capítulo 4 Materiales y Métodos	22
4.1 Línea celular	22
4.2 Medio de cultivo	22
4.2.1 Estabilidad del medio de cultivo	23
4.3 Cultivos estáticos	25
4.4 Cultivos en suspensión	25
4.4.1 Cultivos en frasco agitado	25
4.4.2 Cultivos en biorreactor instrumentado	25

4.4.2.1	El biorreactor	25
4.4.2.2	Programa de control y adquisición de datos	27
4.5	Métodos analíticos	28
4.5.1	Determinación de concentración, viabilidad y tamaño celular	28
4.5.2	Determinación de glucosa, sacarosa y lactato	28
4.5.3	Determinación de fructosa	29
4.5.4	Determinación de aminoácidos	29
4.6	Consideraciones matemáticas	30
4.6.1	Cálculo de parámetros cinéticos del cultivo	30
4.6.2	Cálculo en línea de la velocidad de consumo de oxígeno	32
Capítulo 5	Resultados y Discusión	34
5.1	Estrategia de experimentación	34
5.2	Estabilidad del medio de cultivo	34
5.3	Cultivos estáticos	38
5.3.1	Caracterización	38
5.3.2	Efecto del amonio en el crecimiento celular	44
5.3.3	Efecto del lactato en el crecimiento celular	48
5.3.4	Efecto de la concentración de suero fetal bovino	52
5.4	Cultivo en suspensión	54
5.4.1	Caracterización del crecimiento en frascos agitados	54
5.4.2	Cultivos en biorreactor	60
5.5	Comparación entre los diferentes sistemas de cultivo de células de insecto	66
5.6	Efecto del oxígeno disuelto en el crecimiento celular	67
5.7	Cultivos alimentados en biorreactor	78
Capítulo 6	Conclusiones	86
6.1	Conclusiones particulares	86

6.2 Conclusión general	87
Bibliografía	88
Apéndice I Estabilidad de aminoácidos en medio TNM-FH	94
Apéndice II Cultivos estáticos	97
AII.1 Efecto del amonio en cultivos de células de insecto	101
AII.2 Efecto del lactato en cultivos de células de insecto	101
AII.3 Efecto de la concentración de suero fetal bovino	102
Apéndice III Cultivos en frascos agitados	103
AIII.1 Cultivos con diferentes concentraciones de glucosa	105
Apéndice IV Cultivos en biorreactor instrumentado	109
AIV.1 Cultivos alimentados	116



## Indice de Figuras

Figura 2.1 Metabolismo de las células de insecto	16
Figura 4.1 Frasco T y frasco agitado	23
Figura 4.2 Sistema de control y adquisición de datos	26
Figura 4.3 Impulsor de cuatro paletas modificado	27
Figura 4.4 Diagrama esquemático de una fermentación lote	32
Figura 5.1 Degradación relativa de aminoácidos del medio de cultivo después de 450 h	36
Figura 5.2 Degradación espontánea de glutamina y producción de amonio	37
Figura 5.3 Cinética de crecimiento y consumo de carbohidratos en cultivo estático	39
Figura 5.4 Cinética de consumo y/o producción de aminoácidos en cultivo estático	41
Figura 5.5 Consumo relativo de aminoácidos en cultivo estático	42
Figura 5.6 Consumo y degradación espontánea de glutamina en cultivo estático	44
Figura 5.7 Efecto de la adición de amonio en cinéticas de crecimiento de cultivos estáticos	46
Figura 5.8 Efecto de la adición de amonio en el consumo de glucosa y consumo o producción de lactato por cultivos estáticos	47
Figura 5.9 Efecto de la adición de amonio en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivo estático	48
Figura 5.10 Efecto de la adición inicial de lactato en las cinéticas de crecimiento de cultivos estáticos	50

Figura 5.11 Efecto de la adición inicial de lactato en el consumo de glucosa y la producción o consumo de lactato por cultivos estáticos	51
Figura 5.12 Efecto de la adición de lactato en la velocidad de crecimiento y la concentración celular viable máxima	52
Figura 5.13 Efecto de la concentración de suero fetal bovino en la máxima velocidad específica de crecimiento	53
Figura 5.14 Efecto de la concentración de suero fetal bovino en la concentración celular viable máxima	54
Figura 5.15 Cinéticas típicas de crecimiento y consumo de nutrientes en cultivos en suspensión en frascos agitados	55
Figura 5.16 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en suspensión en frascos agitados	58
Figura 5.17 Consumo relativo de aminoácidos en cultivo en suspensión en frascos agitados	59
Figura 5.18 Cinética de crecimiento y consumo de nutrientes en biorreactor	61
Figura 5.19 El agotamiento de lactato también provoca una disminución en el consumo de oxígeno	63
Figura 5.20 Consumo relativo de aminoácidos en fermentación en lote a 30% OD	65
Figura 5.21 Efecto del OD sobre el crecimiento de células de insecto	68
Figura 5.22 Efecto del OD en el consumo o producción de carbohidratos y lactato	69
Figura 5.23 Efecto del OD en el consumo o producción de aminoácidos	71
Figura 5.24 Efecto del OD sobre la máxima velocidad de crecimiento y la concentración celular máxima de cultivos de células de insecto	72
Figura 5.25 Rendimientos de lactato sobre glucosa a diferentes OD	74
Figura 5.26 Consumo específico de oxígeno a diferentes OD	74

Figura 5.27 Efecto del OD en el consumo específico de oxígeno	75
Figura 5.28 Regresión lineal entre la VCO y la concentración celular viable	77
Figura 5.29 Estimación de la concentración celular viable utilizando la velocidad de consumo de oxígeno	78
Figura 5.30 Cinética de crecimiento y consumo de nutrimentos en cultivo en lote alimentado, caso 1	79
Figura 5.31 Consumo relativo de aminoácidos en cultivo alimentado caso 1	81
Figura 5.32 Cinética de crecimiento y consumo de nutrimentos en cultivo en lote alimentado, caso 2	83
Figura 5.33 Efecto de la adición de cistina al inicio del cultivo	85
Figura AI.1 Degradación espontánea de aminoácidos en medio TNM-FH sin células	95
Figura AII.1 Reproducibilidad de los cultivos estáticos	98
Figura AII.2 Efecto del suero fetal bovino en cultivos estáticos	102
Figura AIII.1 Reproducibilidad de cultivos en frascos agitados	104
Figura AIII.2 Comparación entre cultivo en TNM-FH completo y cultivo en TNM-FH sin glucosa con 0.5 g/L de lactato	106
Figura AIII.3 Cultivo en frascos agitados con 2X concentración de glucosa	107
Figura AIV.1 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor 30% OD	111
Figura AIV.2 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor 10% OD	112
Figura AIV.3 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor a 5% OD	113
Figura AIV.4 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor a 2% OD	114

Figura 5.27 Efecto del OD en el consumo específico de oxígeno	75
Figura 5.28 Regresión lineal entre la VCO y la concentración celular viable	77
Figura 5.29 Estimación de la concentración celular viable utilizando la velocidad de consumo de oxígeno	78
Figura 5.30 Cinética de crecimiento y consumo de nutrimentos en cultivo en lote alimentado, caso 1	79
Figura 5.31 Consumo relativo de aminoácidos en cultivo alimentado caso 1	81
Figura 5.32 Cinética de crecimiento y consumo de nutrimentos en cultivo en lote alimentado, caso 2	83
Figura 5.33 Efecto de la adición de cistina al inicio del cultivo	85
Figura AI.1 Degradación espontánea de aminoácidos en medio TNM-FH sin células	95
Figura AII.1 Reproducibilidad de los cultivos estáticos	98
Figura AII.2 Efecto del suero fetal bovino en cultivos estáticos	102
Figura AIII.1 Reproducibilidad de cultivos en frascos agitados	104
Figura AIII.2 Comparación entre cultivo en TNM-FH completo y cultivo en TNM-FH sin glucosa con 0.5 g/L de lactato	106
Figura AIII.3 Cultivo en frascos agitados con 2X concentración de glucosa	107
Figura AIV.1 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor 30% OD	111
Figura AIV.2 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor 10% OD	112
Figura AIV.3 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor a 5% OD	113
Figura AIV.4 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor a 2% OD	114

Figura AIV.5 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor a 0% OD	115
Figura AIV.6 Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor alimentado, caso I	117

## Indice de Tablas

Tabla 4.1 Composición del medio de cultivo TNM-FH	24
Tabla 5.1 Aminoácidos inestables y su constante específica de degradación	37
Tabla 5.2 Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular máxima en cultivos estáticos	38
Tabla 5.3 Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular máxima en cultivos en suspensión	57
Tabla 5.4 Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular máxima en cultivo en biorreactor	64
Tabla 5.5 Comparación entre cultivos realizados en frasco T, frasco agitado y biorreactor instrumentado	67
Tabla 5.6 Efecto del OD sobre el consumo específico de oxígeno	76
Tabla 5.7 Correlaciones entre VCO y Xv	77
Tabla 5.8 Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular viable máxima del cultivo alimentado, caso 1	82
Tabla 5.9 Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular máxima del cultivo alimentado, caso 2	84
Tabla AI.1 Aminoácidos estables y su concentración media y desviación estándar después de 450 h	96
Tabla AII.1 Coeficiente metabólico específico y rendimiento aparente de aminoácidos y amonio en cultivo estático antes del agotamiento de glucosa	99
Tabla AII.2 Coeficiente metabólico específico y rendimiento aparente de aminoácidos y amonio en cultivo estático durante el consumo de lactato	100
Tabla AII.3 Efecto del amonio en cultivos de células de insecto	101

Tabla AII.4 Efecto del lactato en cultivos de células de insecto	101
Tabla AIII.1 Rendimiento de glucosa en cultivos en suspensión	104
Tabla AIII.2 Tasa metabólica específica y rendimiento aparente de aminoácidos y amonio en cultivo en suspensión en frascos agitados	104
Tabla AIII.3 Rendimientos por mol de carbono de cultivo sin glucosa y cultivo control en frascos agitados	105
Tabla AIV.1 Coeficiente metabólicos y rendimientos a diferentes tensiones de oxígeno	110
Tabla AIV.2 Rendimiento aparente y coeficiente metabólico de los nutrientes clave en cultivo en lote alimentado, caso 1	116

## Nomenclatura

OD	Oxígeno disuelto	%
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento	$h^{-1}$
$\mu_{ap}$	Velocidad aparente de crecimiento	$h^{-1}$
$X_T$	Concentración celular total	cel/mL
$X_v$	Concentración celular viable	cel/mL
$k_d$	velocidad específica de muerte	$h^{-1}$
$S_i$	Concentración del nutrimento "i"	g/L o mM
$q_i$	Coefficiente metabólico (consumo específico del nutrimento "i", o producción específica del producto "j")	mmol/cel h
$Y_{ap}$	Rendimiento aparente	cel/g o cel/mmol
$C_l$	Concentración de oxígeno en el líquido	mmol $O_2$ /L
$C^*$	Concentración de oxígeno a la saturación del líquido	mmol $O_2$ /L
$k_{L,a}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa	$h^{-1}$
$V_l$	Volumen del líquido	L
$q_{O_2}$	Velocidad específica de consumo de oxígeno	mmol $O_2$ /cel h
VCO	Velocidad específica de consumo de oxígeno	mmol $O_2$ /L h
$k$	Constante específica de degradación de aminoácidos	$h^{-1}$



## Resumen

El cultivo de células de insecto ha tenido, últimamente, un gran auge, debido a que, en comparación con el de células de otros eucariotes superiores, las de insecto tienen un fácil manejo y producen altas cantidades de proteína al ser infectadas con un baculovirus recombinante. Sin embargo, las células de insecto tienen requerimientos nutricionales complejos, y son altamente sensibles a los esfuerzos de corte producidos en líquidos agitados. Estas características dificultan proveer nutrimentos suficientes al medio de cultivo (incluyendo oxígeno) para obtener la mayor concentración celular posible. Hasta el momento, se han utilizado estrategias empíricas para resolver este problema, como cambiar completamente el medio de cultivo, o alimentar mezclas complejas de nutrimentos antes de realizar una infección. Con esto se persigue reemplazar posibles nutrimentos agotados o remover posibles desechos metabólicos tóxicos. Estas estrategias aumentan de manera importante el costo de los productos obtenidos a través de las células de insecto y pueden, a su vez, promover la formación de metabolitos tóxicos. En contraste, el diseño de estrategias computarizadas de alimentación de nutrimentos permitiría optimizar los cultivos para obtener la mayor concentración de células viables posible a menores costos y evitando la formación de metabolitos tóxicos. Sin embargo, para poder desarrollar dichas estrategias, es necesario tener un conocimiento completo de las necesidades nutricionales de las células. En la literatura, esta información es aún muy limitada, por lo que en este trabajo se realizó la caracterización del metabolismo de cultivos de células de insecto en cultivo estático y agitado. Así mismo, se determinó el efecto tóxico del amonio y del lactato. Además se caracterizó el efecto de la tensión de oxígeno disuelto sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo. En los cultivos en biorreactor, se determinó en línea el consumo de oxígeno, y se utilizó para inferir en línea el agotamiento de nutrimentos, la concentración celular viable y la fase de crecimiento. Esta información se utilizó para efectuar alimentaciones selectivas de nutrimentos con base en el consumo de oxígeno. Todo esto se realizó para los cultivos de las células de insecto sin infectar, con el fin de determinar sus condiciones óptimas de cultivo. **Esta información podrá ser utilizada posteriormente para obtener la mayor cantidad de proteína recombinante, después de infectar estas células con el virus correspondiente.**

Los principales resultados de este estudio se pueden resumir como sigue:

Se encontró que la glucosa y la cistina fueron los nutrimentos que primero se agotaron en el cultivo de células de insecto Sf-9 en el medio TNM-FH. La glucosa es la principal fuente de

carbono y se agotó aproximadamente a las 100 horas de cultivo, momento en el que iniciara la fase estacionaria de crecimiento. La fructosa solo se consumió cuando la concentración de glucosa en el cultivo fue inferior a 0.2 g/L. La sacarosa no se consumió a lo largo de los cultivos. El lactato fue producido por las células con limitación de oxígeno y fue utilizado como fuente de carbono alterna después del agotamiento de la glucosa. La cistina se agotó antes que la glucosa y su agotamiento no disminuyó la velocidad de crecimiento del cultivo. Cuando se realizaron cultivos alimentados, los aminoácidos glutamina, metionina y el ácido aspártico también se agotaron. Alanina y ácido glutámico se produjeron en todos los cultivos. Sin embargo, aunque la alanina es tóxica para los cultivos, no llegó en ninguno de los casos a niveles tóxicos. Los niveles de lactato y amonio producidos en cultivos en lote se mantuvieron por debajo de las concentraciones tóxicas para las células, las que fueron mayores a 10 y 15 mM, respectivamente. El suero fetal bovino resultó ser un nutrimento indispensable para el crecimiento de células de insecto en medio TNM-FH. La velocidad de crecimiento tuvo un comportamiento tipo Monod con relación con el suero fetal bovino.

El oxígeno disuelto (OD) tuvo un efecto tipo Monod sobre la velocidad de crecimiento. En cultivos con OD superior a 5%, la velocidad de crecimiento y el consumo de nutrimentos permaneció constante. Conforme el OD disminuyó por debajo del 10%, la producción de lactato por mol de glucosa aumentó. Esta relación se utilizó para inferir un OD aparente en sistemas no instrumentados. Este OD aparente puede ser una útil herramienta para determinar el OD promedio en estos cultivos. El consumo específico de oxígeno también tuvo un comportamiento tipo Monod con respecto al OD. Se concluye que los cultivos de células de insecto se deben realizar a un OD mayor al 5%. Al utilizar el consumo de oxígeno medido en línea para inferir el agotamiento de la glucosa y aminoácidos, y realizar en ese momento una alimentación de nutrimentos (glucosa y mezclas de aminoácidos), se obtuvo una concentración celular viable máxima 40% mayor que en los cultivos lote y se mantuvo la fase estacionaria de crecimiento durante más tiempo. Esta estrategia evita la acumulación de metabolitos tóxicos. El consumo de oxígeno determinado en línea permitió, además, inferir la concentración celular y el estado del cultivo.

En este trabajo se obtuvieron las bases para el diseño de estrategias racionales de control de cultivos de células de insecto, como son la alimentación computarizada de nutrimentos y la definición de estrategias adecuadas para el cultivo. Estos conocimientos se aplicaron como un primer paso hacia la consolidación de sistemas computarizados de control.

## Capítulo I

# Introducción

La producción de proteínas con fines terapéuticos y profilácticos cobra mayor importancia día a día. Tradicionalmente, estas proteínas se han obtenido a través de procariotes (bacterias), o eucariotes inferiores (levaduras). Sin embargo, estos organismos no realizan las modificaciones post-traduccionales típicas de células humanas, como son la adición de azúcares ligada a -N u -O, la fosforilación, la acilación, la amidación, la carboximetilación, la isopentilación, el corte específico de péptidos y el corte específico de proteínas. Estas modificaciones son indispensables para que la proteína tenga la funcionalidad adecuada dentro del organismo. En la última década, se han desarrollado varios sistemas de expresión de proteínas utilizando células de eucariotes superiores. Uno de los sistemas más utilizados a nivel laboratorio es el cultivo de células de insecto y baculovirus. Este sistema consiste en la expresión de la proteína de interés a través de un baculovirus recombinante que contiene el gen que codifica para dicha proteína. La proteína se produce después de infectar al cultivo de células de insecto con el baculovirus recombinante. Por lo tanto, la producción de proteínas recombinantes en biorreactores es un proceso de dos etapas: la producción de células de insecto infectables y la producción de la proteína después de la infección.

El sistema baculovirus recombinante/célula de insecto presenta varias ventajas: el nivel de producción de proteína recombinante es alto, comparado con otros sistemas; las células de insecto realizan la mayoría de las modificaciones postraduccionales de manera similar a las células de mamífero, y es altamente versátil, ya que permite la expresión de una gran variedad de proteínas. Estas ventajas han hecho que el sistema tenga **grandes posibilidades de desarrollo futuro**. El sistema se ha utilizado exitosamente para producir  $\beta$ -galactosidasa<sup>67</sup>, factor de crecimiento del nervio humano (rhNGF)<sup>35</sup>, interferon<sup>28, 64</sup>, vacunas contra la fiebre aftosa<sup>60</sup>, y otros más. Algunas de estas vacunas ya cuentan con patentes y se encuentran en pruebas para su producción a gran escala.

Además de la producción de proteínas, las células de insecto se utilizan para la producción de baculovirus silvestre. Este virus es un insecticida natural que infecta

principalmente a lepidópteros y produce su muerte. Ya que hasta el momento no se ha encontrado ningún baculovirus capaz de infectar a vertebrados, se reconoce como un método seguro de control biológico. Sin embargo, las limitantes para utilizar el bioinsecticida es su alto costo y el tiempo largo necesario para que actúe el virus en una población grande de insectos.

Para que el sistema baculovirus pueda ser competitivo, tanto en el área de la producción de proteínas como la de bioinsecticidas, es necesario optimizar el proceso de cultivo de las células de insecto. Sin embargo, la información en cuanto a los requerimientos nutricionales de las células, a el efecto de compuestos tóxicos y a su metabolismo es muy limitada. Esta información es un requisito indispensable para desarrollar estrategias de cultivo de las células para obtener la mayor concentración celular con los menores recursos posibles.

En este trabajo se han determinado los requerimientos nutricionales de las células de insecto tanto en frasco T (cultivos estáticos), frasco agitado y reactor instrumentado. Entre los nutrimentos estudiados se encuentran: el suero fetal bovino, componente del medio de cultivo que incrementa de manera importante el costo del producto; y el oxígeno disuelto, nutrimento que limita frecuentemente el crecimiento, sobre todo en cultivos a mayor escala. Se ha determinado el efecto sobre el crecimiento celular de dos metabolitos tóxicos: el amonio y el lactato. En cultivo en reactor instrumentado se determinó en línea la velocidad de consumo de oxígeno, parámetro que nos permitió monitorear en línea diversos parámetros del estado del cultivo, como concentración celular, fase de crecimiento y agotamiento de nutrimentos. Se implementaron también estrategias de alimentación selectiva de glucosa y aminoácidos.

Todo esto con el fin de lograr obtener la mayor concentración celular posible, lo cual es un requisito indispensable para lograr optimizar la productividad de los cultivos durante la fase de infección.

## Capítulo II

# Antecedentes

### 2.1 El sistema células de insecto/baculovirus

Las proteínas de interés se expresan en las células de los insectos a través de un baculovirus recombinante que contiene el ADN que codifica para tal proteína. Este ADN se coloca en lugar del gene que codifica para la proteína polihedrina o para la proteína p10. La proteína polihedrina protege al virus del medio ambiente, por lo que no es necesaria en el cultivo *in vitro*. La función de la proteína p10 no se conoce, pero su eliminación no afecta la replicación *in vitro* del virus. La polihedrina puede constituir hasta el 50% de la proteína celular, por lo que se pueden obtener niveles altos de expresión de la proteína de interés<sup>6</sup>.

El baculovirus tiene la ventaja de poseer una cápside expandible que permite la inserción de genes muy grandes. Hasta hoy, no se conoce el máximo de inserción de secuencias extrañas. El gene puede contener o no intrones. Se pueden expresar simultáneamente varios genes de subunidades de proteínas, donde generalmente estas proteínas se ensamblan adecuadamente. Las proteínas expresadas se pueden dirigir a diferentes compartimientos celulares o ser excretados por la célula. Actualmente existen ya estuches o "kits" comerciales que permiten la fácil construcción de los virus recombinantes y su aislamiento.

### 2.2 Técnicas de cultivo de células de insecto

La producción *in vivo* de baculovirus, utilizando larvas de insectos, ha sido la forma principal para la producción de bioinsecticidas. Este método requiere de gran cantidad de mano de obra, espacio de trabajo y cuidados especiales. Las larvas infectadas son víctimas fáciles de bacterias y otros parásitos<sup>62</sup>.

Sin embargo, al establecer las técnicas para la producción de proteínas fue necesario desarrollar un sistema más controlado. El cultivo *in vitro* de células de insecto fue la opción

inmediata para la producción de proteínas recombinantes y, debido a sus ventajas, se utiliza cada día más para la producción de bioinsecticidas. Agathos<sup>1</sup> ha resumido algunas de estas ventajas, como son:

- Costos reducidos de capital para el equipo de propagación celular (biorreactores), comparados con los de las elaboradas instalaciones que se requieren para mantener insectos completos
- Costos de mano de obra reducidos
- Costos menores en la cosecha y purificación de la proteína
- Producción de productos virales "limpios": libres de contaminación microbiana y de impurezas indeseables
- Un mejor monitoreo y control de las condiciones de cultivo que permitirán un adecuado control de calidad
- La posibilidad de diseñar plantas automatizadas y de mayor escala
- Una mayor productividad obtenida al aplicar nuevos conocimientos en ingeniería genética o en diseño de biorreactores

Sin embargo, es necesario superar una gran cantidad de problemas para producir la mayor cantidad de producto con los menores recursos. Esto permitirá que los productos obtenidos a través de las células de insecto estén al alcance de la mayor cantidad de gente posible.

Ya que la información disponible sobre el comportamiento en cultivo de las células de insecto es escasa, una práctica común ha sido extrapolar los conocimientos del comportamiento de cultivos de células de mamífero hacia los de células de insecto. Estas suposiciones no son necesariamente ciertas, como hemos comprobado en este trabajo.

**A continuación enlistaremos las principales limitaciones del cultivo *in vitro* y las estrategias que se han seguido hasta el momento para su solución. En el presente trabajo, se utilizó información sobre cultivos de células de mamífero cuando no existía información disponible sobre células de insecto.**

### 2.2.1 Fragilidad celular

Las células de eucariotes superiores son muy sensibles a los esfuerzos de corte del líquido y al estrés hidrodinámico al que son sometidas en biorreactores. Las células de insecto son especialmente sensibles al burbujeo. Bavarian et al.<sup>3</sup> y Chalmers et al.<sup>11</sup> han comunicado los principales mecanismos de daño celular que sufren las células de insecto al interactuar con burbujas en los cultivos. Estos mecanismos son:

- La adsorción de las células a las burbujas acompañada de los esfuerzos de corte a los que se somete la membrana conforme la burbuja asciende en el reactor.
- La unión de las células a la interfase aire-medio y el transporte de estas células a la capa de espuma
- La destrucción de células adsorbidas a las burbujas debido a la liberación de energía potencial al momento de la ruptura de la burbuja
- La destrucción de las células que están cercanas al lugar de ruptura de las burbujas

Todo esto hace difícil proporcionar oxígeno a los cultivos de células de insecto, sin someterlas a las condiciones descritas anteriormente. La solución más efectiva y generalmente utilizada es la adición del copolímero no iónico Pluronic F-68<sup>46</sup>. La adición del Pluronic al medio de cultivo ha permitido el cultivo de células de insecto en reactores con aireación sumergida o en reactores *air lift*<sup>44</sup>. Uno de los mecanismos propuestos del efecto protector del Pluronic F-68 supone que tal aditivo evita que las células se adhieran a las burbujas al bajar la tensión superficial del medio de cultivo<sup>20</sup>. Alternativamente, Murhammer y Gooche<sup>45</sup> proponen que el Pluronic interactúa con la membrana celular, lo que reduce su rigidez y proporciona protección contra el medio ambiente. Así mismo, Ramírez y Mutharasan<sup>55</sup> han dado evidencias de que efectivamente el Pluronic F-68 interactúa con la membrana plasmática. Otros polímeros que han sido utilizados con éxito para proteger a las células son la metilcelulosa y la dextrana<sup>20</sup>.

## 2.2.2 Transferencia de masa insuficiente

La fragilidad de las células de insecto dificulta proveer la cantidad de oxígeno adecuada para el óptimo crecimiento. Esto señala la necesidad de definir la tensión de oxígeno óptima para el crecimiento celular. Sin embargo, existe muy poca información sobre esto en la literatura. Además, la poca información disponible es vaga y poco cuantitativa.

Lindsay y Betenbaugh<sup>35</sup> cuantificaron la producción de  $\beta$ -galactosidasa por Sf-9 en cultivos con y sin abastecimiento de aire al cultivo por medio de aireación superficial (sin burbujear el cultivo). Obtuvieron el doble de  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de aireación superficial. Sin embargo, no midieron el oxígeno disuelto (OD) en ninguno de los cultivos. Scott et al.<sup>61</sup> produjeron una proteína de la cápside del virus de la hepatitis C a 60 y 80 rpm, y consideraron que el cultivo a 80 rpm tenía un OD mayor. Sin embargo, no midieron el OD en estos cultivos, pero sí observaron un aumento en la concentración celular viable y un aumento de 25 veces la producción de la proteína en los cultivos agitados a 80 rpm. Wang et al.<sup>71</sup> realizaron cultivos sin control del OD y otros cultivos con OD de 35%. En el cultivo sin control de OD este disminuyó hasta 0% después de la infección y las células permanecieron viables más tiempo, ya que la falta de oxígeno provocó una infección poco eficiente. Las células con OD de 35% murieron rápidamente debido a lisis provocada por los virus. Wang et al.<sup>71</sup> concluyeron que es necesario que exista oxígeno en el medio de cultivo para que las células puedan mantener su actividad metabólica, y proveer energía y precursores para la síntesis de proteínas. Según Reuveny et al.<sup>58</sup> es necesario mantener un control de OD en el proceso de infección de Sf-9 ya que encontraron una reducción del 30% de la producción de  $\beta$ -galactosidasa entre un cultivo a 15% de OD y uno que suponen se encontraba en exceso de oxígeno. Estos autores no midieron el OD en el cultivo que supuestamente se encontraba con exceso de oxígeno. En estos trabajos no hubo una definición del OD óptimo para el crecimiento celular o para el proceso de infección y producción de las proteínas.

Entre los pocos trabajos que han cuantificado el efecto del OD sobre el crecimiento celular y la producción de proteína se encuentran los de Zhang et al.<sup>72</sup> y Hensler y Agathos<sup>26</sup>. Zhang et al.<sup>72</sup> realizaron cultivos de células de ovario del gusano de seda *Bombyx mori* BM-5 a 10, 20, 30, 40 y 50% de OD. Encontraron una reducción en el crecimiento de 24.84% a OD por debajo de 10%, comparando con cultivos a 30%, en los que obtuvieron la concentración celular máxima. Tampoco indicaron diferencias significativas en el crecimiento celular por arriba del 10%, ni estudiaron el efecto del OD sobre el consumo de nutrimentos. Hensler y



Agathos<sup>26</sup> no encontraron diferencias entre las velocidades de crecimiento, la densidad máxima alcanzada, la viabilidad, el coeficiente metabólico de glucosa y glutamina y el consumo de oxígeno a OD de 100, 50, 10 y 5%. En contraste, Jain et al.<sup>29</sup> encontraron una disminución de aproximadamente el 25% de la velocidad de crecimiento a 65% de OD en relación a cultivos a OD de 10 y 110%. Además, encontraron que el consumo específico de oxígeno en la fase de producción de la proteína (antistasina) era mayor conforme el OD aumentaba. La velocidad específica de consumo de oxígeno fue el doble en el cultivo a 65% (4-6 moles O<sub>2</sub>/cel s) que en el cultivo a 10%, (2-3 moles O<sub>2</sub>/cel s) y 4 veces mayor a 110% (9-12 moles O<sub>2</sub>/cel s) que a 10 %. Sin embargo, este trabajo es poco cuantitativo, ya que no menciona las concentraciones de proteína obtenidas, ni el valor exacto de la velocidad específica de consumo de oxígeno.

### 2.2.3 Toxicidad de metabolitos

El amonio ha sido reportado como el principal metabolito tóxico para células de mamíferos. El amonio se produce por la célula al metabolizar la glutamina. Por cada molécula de glutamina que se metaboliza se generan dos moléculas de amonio. Además, la glutamina presente en el medio de cultivo libera a amonio al descomponerse espontáneamente. Esta descomposición sigue una cinética de primer orden y depende del pH, fuerza iónica, temperatura y composición del medio de cultivo<sup>50</sup>.

El amonio actúa como una base débil (NH<sub>3</sub>) y al aceptar un protón se convierte en un ácido débil (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Es el NH<sub>3</sub> disuelto, no el ion amonio, el que es soluble en lípidos y al que las células de mamífero son permeables<sup>15, 36</sup>. El ion amonio es introducido a la célula por ciertas proteínas de transporte, entre las que están la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa y el cotransportador Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup>. El ion amonio se une al sitio de unión de potasio, el sustrato natural de estas proteínas<sup>36</sup>. Este transporte es más lento que la difusión del NH<sub>3</sub>. Ya que el equilibrio amoniaco-amonio depende del pH, es claro que la acción del amonio en términos de toxicidad, regulación celular, etc. es una función del pH<sup>25, 37</sup>. Sin embargo, una vez que el NH<sub>3</sub> atraviesa la membrana celular, se puede asociar con un protón para formar el ion amonio, dependiendo del pH presente en la matriz intracelular. Se han propuesto dos mecanismos de daño celular provocado por el ion amonio y/o el amoniaco<sup>38</sup>. En el primero el amoniaco es el principal responsable del daño celular. El amoniaco provoca una alcalinización de los lisosomas, lo que lleva a vacuolación y muerte celular. Este mecanismo depende del pH extracelular. En el

segundo mecanismo, el ion amonio es el principal tóxico. El transporte del ion amonio interfiere con el transporte de potasio al interior de la célula, lo que afecta el gradiente de potasio celular y evita que exista potasio disponible como cofactor de enzimas<sup>36</sup>. Este desbalance iónico puede afectar el metabolismo celular. El transporte de amonio al interior de la célula tiene un costo energético inútil para la célula. Además el amonio intracelular altera el pH de la mitocondria y el citoplasma celular, por lo que la célula debe neutralizarlos, lo que provoca un gasto energético mayor. Este mecanismo es independiente del pH extracelular. Ambos mecanismos actúan al mismo tiempo.

Hassell et al.<sup>25</sup> han clasificado a las líneas celulares de mamífero en tres grupos, según su respuesta al amonio añadido extracelularmente: a) las que no son afectadas por concentraciones hasta 2.5 mM (células Vero, epiteliales humanas 293 y fibroblastos humanos diploides); b) las que son parcialmente inhibidas con 2mM respecto a sus rendimientos por mol de sustrato normales en un 50-60% (células McCoy y MDCK); y c) en las que sus rendimientos finales se ven reducidos en más de un 75% con 2mM de NH<sub>4</sub>Cl (células HeLa y BHK). Miller et al.<sup>40</sup> reportaron que los cultivos de hibridomas presentan una disminución de la velocidad de crecimiento y en la producción de amonio a concentraciones de amonio por encima de 5mM. Hansen y Emborg<sup>24</sup> observaron en células CHO un aumento del 30% del coeficiente metabólico de alanina acoplado con una disminución del coeficiente de producción de amonio a concentraciones de amonio altas (6-8mM). Este cambio en el metabolismo del amonio fue explicado por Miller et al.<sup>40</sup> como el uso de la ruta de la alanina aminotransferasa en la conversión de glutamato a 2-oxoglutarato en lugar de la ruta de la glutamato deshidrogenasa. Ozturk y colaboradores<sup>51</sup> comunicaron para el mismo tipo de cultivo, una disminución de la velocidad específica de crecimiento del 50% con 4 mM de amonio. Aunque la concentración típica de amonio que alcanza un cultivo es de 2 a 5 mM, esta concentración aumenta en cultivos alimentados con glutamina o en cultivos con altas densidades celulares.

**Basados en esta información se había pensado que las células de insecto eran igualmente sensibles al amonio, hasta que en 1993 Bédard et al.<sup>5</sup> reportaron el efecto del amonio en el crecimiento celular y su producción por cultivos en lote de células de insecto. El amonio prácticamente no se produjo y no fue tóxico en concentraciones hasta de 10 mM. Esta diferencia en la toxicidad de amonio puede deberse a la diferencia de pH entre el cultivo de células de mamífero y el de células de insecto. Las células de insecto crecen a un pH menor (6.2) que las células de mamífero (7.2-7.3). Como ya se explicó, el pH menor favorece la formación del ion amonio en el medio de cultivo en lugar del amoniaco. Asimismo, se sabe**

que la formación de amonio por descomposición de la glutamina, disminuye en forma importante al disminuir el pH<sup>50</sup>.

Stravoulakis y colaboradores<sup>65</sup> han reportado el consumo de amonio por células del gusano de la seda (*Bombix mori*). Este consumo fue registrado en concentraciones altas de glutamina y aparentemente sucede debido a cambios en el metabolismo celular que resultan en una mayor tasa de formación de ácido úrico, y, por lo tanto, un mayor consumo de amonio. En Sf-9 se detectó ácido úrico solamente al final del cultivo en niveles muy pequeños<sup>4</sup>. Öhman et al.<sup>49</sup> suponen que existe consumo de amonio acoplado a la producción de alanina en células Sf-9.

Además del efecto del amonio sobre el crecimiento celular, se ha reportado su efecto sobre la adición de azúcares y el procesamiento de proteínas. Gooche y Monica<sup>21</sup> reportan que la adición de 14mM de amonio a células plasmáticas en cultivo ocasiona la secreción de anticuerpos deficientes en el síalico terminal. Dyken y Sambanis<sup>17</sup> no encontraron efecto sobre el crecimiento de células endocrinas con 6mM de amonio. Sin embargo, esta concentración afectó el procesamiento y adición de azúcares a proteínas producidas por las células. Cacciuttolo et al.<sup>8</sup> indicaron que en cultivos de células de insecto, el amonio y el lactato inhibían la expresión de proteínas en células de insecto Sf-9 y High 5, aún en concentraciones que no inhiben el crecimiento celular. Esto ha confirmado la importancia de controlar la producción de amonio en los cultivos.

El lactato es el otro metabolito que tiene importante efecto tóxico en las células de mamífero. El lactato es el principal subproducto del metabolismo de glucosa en el metabolismo anaerobio, aunque también puede ser producido a partir de la glutamina. En el caso de las células malignas, como los hibridomas, hay una tendencia a la glucólisis incluso cuando el cultivo no está limitado de oxígeno. La producción de lactato depende de la concentración de glucosa, la actividad celular y las condiciones ambientales. Se ha determinado que el lactato es tóxico en cultivos en donde no hay control de pH. La concentración a la que el lactato es inhibitorio generalmente es mucho mayor que la del amonio. Ozturk y colaboradores<sup>51</sup> reportaron que en cultivos de hibridomas el lactato era tóxico a concentraciones alrededor de 55 mM. Atribuyeron el efecto del lactato a un aumento en la osmolaridad del medio de cultivo. No observaron una disminución significativa de pH.

Bédard et al.<sup>4</sup> y Kamen et al.<sup>31</sup> reportaron para cultivos de células de insecto que solo había producción de lactato cuando los cultivos no se encontraban en condiciones óptimas. Sin embargo, no indicaron cuáles son esas condiciones y hasta que punto afectaban el crecimiento celular. Bédard y colaboradores<sup>5</sup> reportaron un consumo de lactato al final del cultivo.

Además del amonio y el lactato, otros productos también pueden ser tóxicos, aunque poco hay reportado al respecto. Roberts<sup>59</sup> reportó la posible existencia de una sustancia tóxica no dializable que limitaba el crecimiento celular. Lindsay et al.<sup>35</sup> y Bédard et al.<sup>5</sup> reportaron la existencia de alguna otra toxina, no especificada, que limitaba el crecimiento.

#### 2.2.4 Requerimientos nutricionales complejos

Las células de eucariotes superiores requieren de una gran variedad de sustancias para que sea posible su cultivo *in vitro*. Estos requerimientos hacen que los productos obtenidos a través de estas células sean muy caros. Sin embargo, su importancia terapéutica ha justificado su elevado precio.

El suero fetal bovino aporta factores de crecimiento, hormonas, inactiva materiales tóxicos, provee proteínas acarreadoras que estabilizan y hacen disponibles hormonas y nutrimentos a la célula, provee nutrimentos que suplementan la composición del medio de cultivo, contiene inhibidores de proteasas, afecta la solubilidad de nutrimentos y afecta las propiedades físicas del medio de cultivo (osmolaridad, coeficientes de transferencia de masa)<sup>30</sup>. Este suero sustituyó a la hemolinfa de insecto, que tenía problemas de melanización y de alto costo<sup>41</sup>. Las células de insecto no pueden crecer sin suero o sin los sustitutos, definidos e indefinidos, que se han diseñado para reemplazarlo. El diseño de medios de cultivo sin suero ha facilitado la purificación de las proteínas obtenidas en cultivos de células de insecto. Sin embargo, las sustancias que sustituyen al suero son igual o más costosas que el suero en sí. En **hibridomas Dalili y Ollis<sup>14</sup> comunicaron que la velocidad de crecimiento en cultivos limitados por suero seguía una cinética tipo Monod. En ese trabajo se utilizó 2% de suero como la menor concentración. Léry y Fediere<sup>34</sup> reportaron para cultivos de células del insecto *Christoneura fumiferana*, un crecimiento celular muy lento y muerte con 5% de suero fetal bovino en medio Grace. A 2% de suero no sobrevivieron las células. A nuestro conocimiento, este es el único trabajo sobre efecto de la concentración de suero fetal en el crecimiento de**

células de insecto, aunque existen varios trabajos sobre la sustitución de suero fetal bovino por yema de huevo<sup>12</sup> u otros suplementos<sup>22</sup>.

Las células de insecto pueden utilizar varias fuentes de carbono. La glucosa ha sido identificada como la principal<sup>5, 23, 57</sup>. La maltosa y la fructosa se consumen a partir de que la glucosa disminuye a valores limitantes. Kamen et al.<sup>31</sup> reportaron consumo de lactato después del agotamiento de glucosa y glutamina. Este comportamiento de los cultivos de células de insecto resultó inesperado ya que el lactato es reconocido como un tóxico importante para cultivos de células de eucariotes superiores<sup>51</sup>.

En cuanto a la sacarosa, existen reportes contradictorios sobre si es utilizada o no por las células de insecto. Este carbohidrato ha sido adicionado al medio de cultivo para ajustar la osmolaridad. Reuveny et al.<sup>57</sup> observaron que no había crecimiento celular cuando la sacarosa era la única fuente de carbono disponible. Bédard et al.<sup>4</sup> y Ferrance et al.<sup>19</sup> informaron que la sacarosa no se consumía. Stravoulakis et al.<sup>65</sup> reportaron la degradación de la sacarosa por células, con el consecuente consumo de la glucosa y acumulación de la fructosa. Wang et al.<sup>69</sup> han sugerido la producción de  $\alpha$  glucosidasa activa por células de Sf-9 infectadas y la consecuente hidrólisis de la sacarosa con la utilización posterior de la glucosa formada. Grace y Brzostowski<sup>23</sup> y Clements y Grace<sup>13</sup> observaron el consumo de sacarosa por células del ovario de *A. eucalepti* a partir de que la concentración de glucosa se encuentra por debajo de 1.6 mM.

Mitsubishi<sup>43</sup> ha determinado los aminoácidos esenciales para diferentes líneas de células de insectos. En este estudio no se incluye a la línea Sf-9. Sin embargo, podemos hacer extrapolaciones hacia esta línea celular. Mitsubishi ha dividido los aminoácidos en los siguientes grupos:

- **$\alpha$  alanina.** La concentración de este aminoácido aumenta conforme aumenta la edad del cultivo como resultado de una transaminación entre los ácidos pirúvico y glutámico y de la degradación de otros aminoácidos y de la proteína del suero. No es esencial para el crecimiento celular. Bédard y colaboradores<sup>5</sup> indicaron la producción de alanina por Sf-9 en TNM-FH hasta el agotamiento de glucosa. A partir de que se ha agotado la glucosa la alanina se consumía, debido a su transaminación para producir glutamato y piruvato.

- Acido aspártico, cistina, glutamina y metionina. Estos aminoácidos se consumen en altas cantidades durante los cultivos. El ácido aspártico no es esencial o se requiere en muy bajas cantidades para el cultivo de células de insecto. La falta de cistina, un aminoácido esencial, tiene efectos muy marcados en el crecimiento de células de insecto. La falta de metionina impide el crecimiento celular, por lo que también es un aminoácido esencial.
- Asparagina, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, triptofano y valina. El consumo de estos aminoácidos es menor que para los del grupo anterior. La asparagina no es esencial para el cultivo de células de insecto, aunque Grace y Brzostowski<sup>23</sup> reportaron un alto consumo por células de ovario de *A. eucalepti*. La falta de isoleucina imposibilita el crecimiento celular. La leucina es un aminoácido esencial. La falta de fenilalanina impide el cultivo prolongado de las células de insecto y limita el crecimiento. La falta de treonina no tiene efectos marcados en el crecimiento celular. Sin embargo, sin ella es imposible mantener las células a largo plazo. El triptofano limita el crecimiento de células de lepidópteros. La valina es un aminoácido esencial para células de insecto.
- Arginina, glicina, lisina y serina. La concentración de estos aminoácidos cambia muy ligeramente durante los cultivos. Se supone que la arginina es importante como parte del ciclo de la ornitina. Es esencial para el cultivo de células de insecto. La glicina<sup>66</sup>, la lisina y la serina son aminoácidos esenciales.
- $\beta$  alanina, ácido glutámico y prolina. Los patrones de consumo de estos aminoácidos varían entre las diferentes líneas celulares. La  $\beta$  alanina, aminoácido no proteico precursor del ácido pantoténico, es tóxica para la mayoría de las líneas celulares de insecto en cultivo. La falta de prolina no produce un efecto marcado en el crecimiento celular. Sin embargo, es un aminoácido esencial a largo plazo. El ácido glutámico puede ser producido o consumido. Es un aminoácido no esencial. Se ha reportado<sup>5</sup> su consumo por Sf-9 durante todo el cultivo, probablemente para producir  $\alpha$  cetoglutarato y amonio por la acción de la glutamato deshidrogenasa.
- Histidina y tirosina. El perfil de estos aminoácidos cambia durante el cultivo. Según Mitsuhashi<sup>43</sup>, la histidina y la tirosina son esenciales para el cultivo de células de

insecto, mientras que Grace y Brzostowski<sup>23</sup> reportaron la producción de histidina por células de ovario de *A. eucaleari*.

Tremblay y colaboradores<sup>66</sup> concluyeron que las células de insecto Sf-9 son auxótrofas para cistina y glicina, pero no para metionina o serina. Esto se debe a que las células Sf-9 no tienen la enzima necesaria para la síntesis de estos aminoácidos, la hidroximetiltransferasa de serina. La falta de esta enzima es un caso único en las células de eucariotes y confirma las diferencias de metabolismo entre mamíferos y células de insecto. A pesar de esto la cistina no es un aminoácido medido rutinariamente en cultivos de células de insecto. Radford et al.<sup>53</sup> han reportado a la cistina como el único aminoácido que se agota en cultivos de Sf-9.

La glutamina es el aminoácido de mayor importancia en el cultivo de células de mamíferos. Es importante para la síntesis de purinas, pirimidinas, glucosaminas y asparagina. Reitzer y colaboradores<sup>56</sup> presentan evidencia de que la glutamina es la principal fuente de energía en células HeLa. Aparentemente, la oxidación de glucosa y glutamina está controlada coordinadamente en varias líneas celulares<sup>7</sup>. Cuando la fructosa o galactosa son la fuente de carbono, el porcentaje de energía obtenida a través de la glutamina es mayor que cuando la glucosa es la fuente de carbono. El consumo de glutamina, para obtener energía, origina dos moles de amonio, mientras que su uso para biosíntesis origina solo una. La ruta del metabolismo de la glutamina en células de mamífero se llama glutaminólisis. El amonio y el lactato son subproductos importantes en esta ruta. Durante la deaminación de la glutamina por la glutaminasa se produce una cantidad considerable de amonio<sup>36</sup>.

Bédard et al.<sup>5</sup> han propuesto para células Sf-9 el mapa metabólico que se muestra en la **Figura 2.1**. En esta figura se muestra el metabolismo de carbohidratos y glutamina y la producción y el consumo de amonio y lactato.

Con esta información se han diseñado medios y estrategias de cultivo de células de insecto. Ferrance et al.<sup>19</sup>, Kamen et al.<sup>31</sup>, Wang et al.<sup>70, 71</sup>, Roberts<sup>69</sup> y Stravoulakis et al.<sup>65</sup> consideraron a la glutamina y a la glucosa como los nutrientes claves en el cultivo de las células de insecto. Ferrance et al.<sup>19</sup> reportaron a la glutamina y al glutamato como los aminoácidos limitantes y como fuente de energía. Bédard et al.<sup>5</sup> reportaron una producción lenta de amonio en cultivos de Sf-9, por lo que aseveraron que la glutaminólisis no era importante en el cultivo. Sin embargo, aunque la glutamina era el aminoácido de mayor consumo, no llegaba a agotarse y no limitaba el crecimiento. Öhman et al.<sup>49</sup> debatieron la

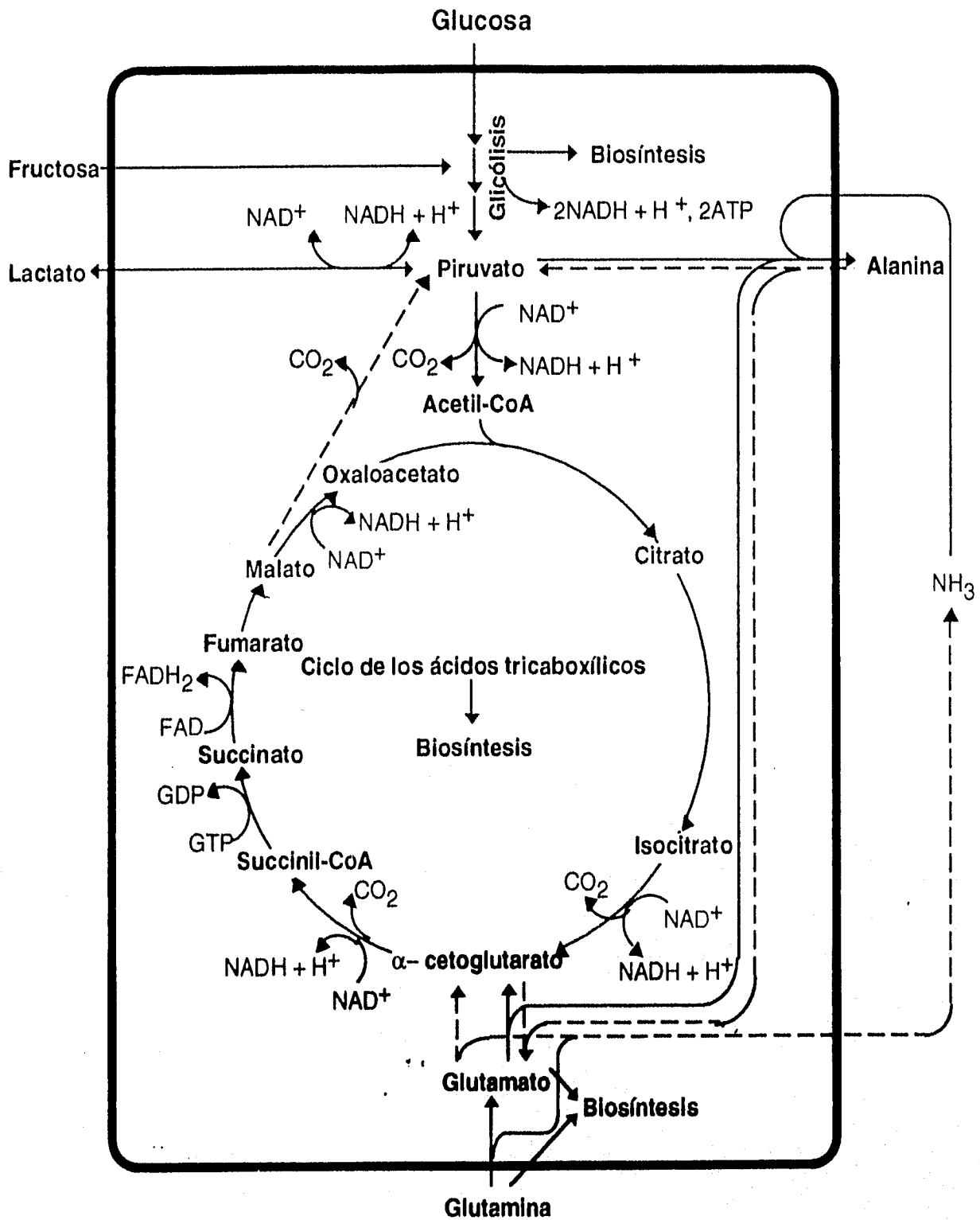


Figura 2.1 Metabolismo de las células de insecto. Modificado de Bédard et al.<sup>5</sup> y Öhman et al.<sup>50</sup>



hipótesis de Bédard, pues el consumo de glutamina por las células de insecto es demasiado grande para que toda sea utilizada para la biosíntesis. Además sostienen la hipótesis de que la glutamina puede ser sintetizada por células Sf-9.

También el ácido glutámico ha sido considerado como un aminoácido clave en el cultivo de células de insecto. Bédard et al.<sup>5</sup> señalan al ácido glutámico como el aminoácido de mayor consumo por Sf-9. Ferrance et al.<sup>19</sup> reporta limitación del crecimiento por falta de ácido glutámico.

Ya que la alanina es tóxica para células de mamífero, se ha planteado que puede ser tóxica para células de insecto. Sin embargo, la adición de alanina a los cultivos de células de insecto ha demostrado que no es tóxica hasta niveles de 40mM<sup>4, 26</sup>, mientras que los niveles típicos que se alcanzan en cultivo difícilmente rebasan valores de 12mM<sup>4</sup>. La producción de alanina por las células de insecto esta acoplada al metabolismo de la glucosa. La glucosa es la principal fuente de carbono para alanina y regula su formación. Una baja concentración de glucosa conduce al consumo de alanina, mientras que una alta concentración de glucosa conduce a la producción de alanina vía la glutamato-piruvato transaminasa<sup>49</sup>. La alanina es un subproducto de la glicólisis<sup>40</sup>.

El medio para el cultivo de células de insecto contiene frecuentemente ácidos orgánicos como ácido cetoglutárico, succínico o málico. Estos ácidos se han catalogado como no esenciales para el cultivo de células de insecto<sup>49</sup>. La mayoría de las células de vertebrados e invertebrados no pueden sintetizar ácidos grasos esenciales y tienen una capacidad muy limitada para la desaturación y elongación de los ácidos grasos. Los lípidos son nutrientes indispensables para el cultivo de células de insecto y para la producción de baculovirus<sup>22</sup>. La falta de ellos puede ocasionar degeneración de las células y falta de infectividad del virus. Las células de insecto, a diferencia de las de mamífero, no pueden sintetizar colesterol<sup>41</sup>. **Sin embargo, el colesterol no se ha caracterizado como un nutriente esencial. Inclusive, según Léry y Fediere<sup>34</sup> el colesterol inhibe el crecimiento celular.**

Mitsuhashi<sup>42</sup> reporta al extracto de levadura como la principal fuente de vitaminas en el cultivo de células de insecto. Las vitaminas esenciales para varias líneas celulares de insecto son la tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido fólico, niacinamida, inositol, colina, carnitina y vitamina B-12<sup>41</sup>.

### 2.3 Estrategias utilizadas para mejorar el cultivo *in vitro*

Se han desarrollado varias estrategias para contender con los problemas antes mencionados.

Como ya se ha mencionado anteriormente, para contender con el problema de la fragilidad celular se han utilizado aditivos como el Pluronic F-68 y la metilcelulosa para proteger a las células de los esfuerzos de corte. Sin embargo, el uso de estos compuestos disminuyen el coeficiente de transferencia de masa de manera importante<sup>47</sup>. Esto, aunado a la ya baja transferencia de masa característica de estos sistemas, ha llevado al diseño de impulsores tales como hélices helicoidales<sup>31</sup>; y de métodos de cultivo novedosos, como biorreactores *air-lift*<sup>47</sup>.

Para evitar la limitación de nutrimentos en el sistema y la acumulación de metabolitos tóxicos, se han utilizado: el cultivo continuo<sup>16</sup>, la perfusión<sup>10</sup> y el cultivo en lote alimentado<sup>5, 19, 48, 59, 65, 71</sup>. En el cultivo continuo, se subutiliza el medio de cultivo, mientras que en la perfusión es difícil lograr una separación eficiente de las células del medio de cultivo debido a que las células sufren daño celular<sup>9</sup>, los filtros de separación se obstruyen, y los sistemas suelen ser complejos por lo que corren mayores riesgos de contaminación. Varios grupos han utilizado la estrategia de cambiar el medio de cultivo antes de proceder a la infección. Hensler y Agathos<sup>26</sup>, Kioukia et al.<sup>32</sup>, Bédard et al.<sup>5</sup>, Roberts<sup>59</sup> y Lindsay et al.<sup>35</sup> han utilizado esta estrategia con éxito. Sin embargo, el procedimiento de separar las células y el medio tiene riesgos de contaminación y de daño celular. Esto sin considerar el elevado costo del medio de cultivo que es subutilizado.

El cultivo en lote alimentado ha sido utilizado con el fin de optimizar el cultivo de células de insecto y como herramienta para estudiar el metabolismo de las células de insecto<sup>65</sup>. Roberts<sup>59</sup> alimentó glutamina, con lo que aumentó la concentración celular en un 43.5%, comparada con el caso de reemplazar totalmente el medio de cultivo. Además, adicionó un 50% de medio fresco (aumentó la concentración celular en un 54.5%, comparada con el caso de reemplazar totalmente el medio), reajustó el pH (aumento en la concentración celular significativa no cuantificada comparada con el caso de reemplazar totalmente el medio) y alimentó suero fetal bovino (aumentó la concentración celular en un 46%, comparada con el caso de reemplazar totalmente el medio). Wang et al.<sup>71</sup> alimentaron glucosa y glutamina con lo que tuvieron un aumento en la concentración celular y en la producción de proteína, aunque

no determinaron glutamina. Nguyen et al.<sup>48</sup> alimentaron glucosa y glutamina, con lo que aumentó marginalmente la concentración celular y disminuyó el rendimiento de la proteína rhNGF (factor de crecimiento del nervio humano). Posteriormente alimentaron glucosa, glutamina y extracto de levadura, con lo que aumentó la concentración celular y la producción de proteína. La alimentación de lípidos no incrementó la concentración celular, pero aumentó la producción de la proteína. En fermentaciones alimentadas 5 veces con glucosa, glutamina, extracto de levadura y lípidos, obtuvieron una concentración celular 5 veces mayor que la obtenida en cultivos lote. Estos autores no infectaron este cultivo.

Bédard et al.<sup>5</sup> alimentaron diferentes concentrados de nutrimentos. Con la alimentación de un concentrado de aminoácidos (Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Iso, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Val, Cys) o de un ultrafiltrado de extracto de levadura (50X) obtuvieron una recuperación de la velocidad específica de crecimiento del 95% comparada con el caso de reemplazar totalmente el medio. Además, reportaron un aumento en la cantidad de proteína por célula.

Estas últimas investigaciones favorecen la hipótesis de la limitación del crecimiento por falta de algún nutrimento, y no por la presencia de un agente tóxico. Asimismo, apuntan hacia la necesidad de plantear mejores estrategias de alimentación de nutrientes.

Caron et al.<sup>9</sup> observaron una disminución de la producción de proteína en cultivos con altas concentraciones celulares. Esta disminución se eliminó cuando cambiaron el medio antes de infectar el cultivo, por lo que supusieron la presencia de un agente tóxico. Sin embargo, no determinaron la concentración de los nutrimentos en el medio de cultivo, por lo que no pueden asegurar que todos los nutrimentos se encontraban en concentraciones no limitantes en los cultivos con altas densidades celulares. Ferrance et al.<sup>19</sup> alimentaron glucosa a cultivos de Sf-9 con medio IPL-41 cuando esta estaba agotada, pero no observaron ninguna diferencia en la concentración celular o la velocidad de crecimiento entre este cultivo y uno donde se añadió la misma concentración de glucosa al inicio del cultivo. Sin embargo, no reportaron si hubo diferencia entre la concentración de lactato de ambos cultivos. La mayor concentración de glucosa al inicio del cultivo pudo haber generado mayor cantidad de lactato, que sería tóxico en cultivos con altas concentraciones celulares.

Ninguna de las estrategias mencionadas está basada en el análisis del metabolismo de las células de insecto, y simplemente son procedimientos empíricos. Esto provoca un alza del

costo de los cultivos, como en el caso de reemplazar totalmente el medio; así como una mayor generación de metabolitos tóxicos, ya que se proporcionan nutrimentos en exceso al cultivo. El desarrollo de estrategias de alimentación selectiva y racional de nutrimentos de forma automática debe permitir obtener cultivos con mayores concentraciones celulares y viabilidades mayores, antes de la infección. Esto deberá resultar en el aumento del rendimiento de proteína recombinante. Para desarrollar estas estrategias es necesario tener conocimiento de las necesidades nutricionales de los cultivos.

Se ha explorado el uso de parámetros que puedan ser medidos en línea y que permitan hacer inferencias sobre el estado del cultivo. Estos parámetros permiten tomar decisiones sobre los cultivos casi inmediatamente que ha ocurrido un hecho relevante, como el agotamiento de algún nutrimento o el alcanzar una cierta densidad celular. En cuanto a cultivos alimentados, el consumo de oxígeno ha sido utilizado por Ramírez y Mutharasan<sup>54</sup> para detectar el agotamiento de glutamina en cultivos de hibridomas y alimentarla en ese momento. Utilizando esta estrategia, la concentración celular aumentó de  $3.5 \times 10^6$  cel/mL a  $5.7 \times 10^6$  cel/mL; y la concentración de anticuerpos monoclonales de 28 mg/L a 60 mg/L. Posteriormente, Higareda<sup>27</sup> ha utilizado el consumo de oxígeno para detectar, además del agotamiento de glutamina, el agotamiento de glucosa. Al alimentar glucosa, utilizando el consumo de oxígeno para detectar su agotamiento, obtuvo un incremento de 600% de la concentración celular máxima y un 300% de la productividad de anticuerpos monoclonales, comparando con cultivos lote. Eyer<sup>18</sup> utilizó también el consumo de oxígeno para alimentar glutamina en cultivo de hibridomas, y obtuvo el doble de concentración celular y el triple de anticuerpos monoclonales, comparado con cultivo lote. En cultivos de células de insecto, el grupo del Dr. Amine Kamen (Biotechnology Research Institute, Canada. Comunicación personal) ha utilizado la velocidad de generación de CO<sub>2</sub> para monitorear el estado de los cultivos, especialmente para comprobar la eficiencia de las infecciones.

**En resumen, para cultivos de células de insecto no existe información concluyente sobre los requerimientos de carbohidratos, aminoácidos, suero fetal bovino y oxígeno; así como el efecto tóxico del amonio y el lactato. Esta información es indispensable para diseñar estrategias de control computarizadas para los cultivos. La aplicación de dichas estrategias permitirá optimizar el cultivo de las células de insecto, y la posterior producción de proteínas a partir de ellas.**

## Capítulo III

# Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Desarrollar estrategias de control computarizadas de adición de nutrimentos para optimizar el cultivo de células de insecto Sf-9 (antes de la infección) en biorreactores agitados.

### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar los requerimientos nutricionales de células de insecto Sf-9 en cultivos estáticos y agitados:
  - Carbohidratos: glucosa, fructosa y sacarosa
  - Aminoácidos
  - Suero fetal bovino
  - Oxígeno
- Determinar el efecto tóxico del amonio y el lactato
- Utilizar mediciones en línea del consumo de oxígeno para identificar el agotamiento de nutrimentos y suplementarlos selectivamente.

## Capítulo IV

# Materiales y Métodos

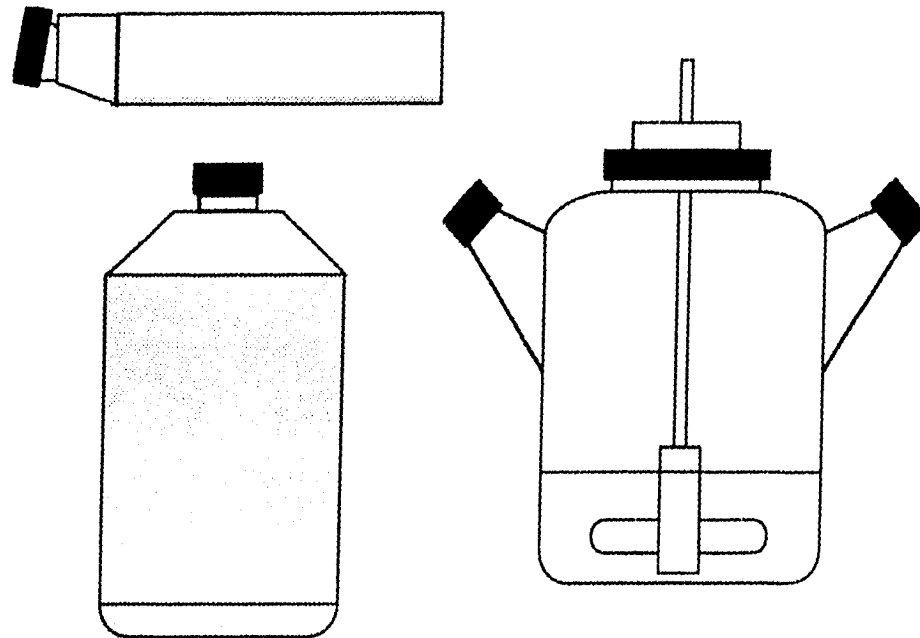
### 4.1 Línea Celular

Se utilizó la línea celular Sf-9 (Número de catálogo de la ATCC 1711). Esta línea celular proviene del ovario de pupa del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (conocido trivialmente en México como gusano cogollero del maíz y en Estados Unidos como gusano soldado de otoño). La línea Sf-9 fue clonada en 1983 por Smith et al.<sup>64</sup>, a partir de la línea Sf-21, obtenida por Vaughn et al.<sup>68</sup> en 1977. Todos los experimentos se realizaron a partir de un mismo lote de células congeladas en nitrógeno líquido. Las células se congelaron en un número de pase desconocido, al que se tomó como pase cero. El número de pase es el número de veces que las células se han subcultivado a partir de que se obtuvo la línea celular del tejido original. En todos los experimentos, las células se mantuvieron solo hasta un número de pase de 50 después de descongeladas. Las células para inóculo se mantuvieron en cultivo a 27°C en atmósfera sin provisión de CO<sub>2</sub>, en cultivo estático en frasco T, excepto para los cultivos en biorreactor, en donde se mantuvieron en frascos agitados a 100 rpm. En la **Figura 5.1** se muestra un diagrama de los frascos T y los frascos agitados. Es importante mencionar que las células en cultivo estático se adhieren a la pared del frasco. Todos los inóculos se realizaron con células en fase de crecimiento exponencial, y se inoculó siempre con una concentración celular de  $0.2 \times 10^6$  cel/mL y con una viabilidad superior al 90%. Con este procedimiento se asegura que todos los experimentos fueron inoculados con células en las mismas condiciones.

### 4.2 Medio de Cultivo

Se utilizó el medio TNM-FH (*Trichoplusia ni* medium- Fred Hink, Sigma, T-1032. Ver composición en **Tabla 4.1**). El medio se disolvió en agua filtrada en un equipo Milli-Q (Millipore Corporation) y se ajustó a pH 6 con hidróxido de sodio 1M. Después de esterilizar el medio por filtración a través de membrana de 0.22 µm, se suplementó con 10% v/v de suero fetal bovino (Sigma, F-2449) y con 0.05% de Pluronic F-68 (BASF). En el caso de experimentos en biorreactor, se adicionó además 1% v/v de solución antibiótica-antimicótica

(Sigma A9909; penicilina 100,000 U/L; estreptomicina 100 mg/L; anfotericina, 250µg/L). Después de filtrar, el medio queda con un pH final de 6.2.

**Frasco T****Frasco Agitado**

**Figura 4.1 Frasco T y frasco agitado.** Las células de insecto se cultivan en frasco T en posición horizontal, como se muestra en la figura superior. Las células se adhieren a la pared, lo que se puede observar en la ilustración inferior. En los frascos agitados las células permanecen en suspensión.

#### 4.2.1 Estabilidad del medio de cultivo.

En un frasco T de 75 cm<sup>2</sup> a 27 °C se colocaron, durante 470 horas, 30 mL de medio libre de células con 10% de suero fetal bovino preparado como se ha descrito anteriormente. Se tomó muestra diariamente para monitorear la degradación espontánea de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo, y poder así considerar esta degradación espontánea en el cálculo de consumo de aminoácidos por las células.

**Tabla 4.1 Composición del medio de cultivo TNM-FH**  
Tomado del inserto proporcionado por Sigma

Compuesto	Concentración g/L	Compuesto	Concentración g/L
Cloruro de calcio (anhidro)	1.00	L-triptofano	0.1
Cloruro de magnesio (anhidro)	1.07	L-tirosina 2Na	0.07
Sulfato de magnesio (anhidro)	1.36	L-valina	0.1
Cloruro de potasio	2.24	Acido p-aminobenzoico	0.00002
Fosfato de sodio monobásico	0.88	D-biotina	0.00001
$\beta$ -alanina	0.20	Cloruro de colina	0.0002
L-alanina	0.23	Acido fólico	0.00002
L-arginina HCl	0.70	Inositol	0.00002
Acido L-aspartico	0.35	Niacina	0.00002
L-asparagina	0.35	Acido D-pantoténico	0.00002
L-cistina 2HCl	0.03	Pirridoxina HCl	0.00002
Acido L-glutámico	0.60	Riboflavina	0.00002
L-glutamina	0.60	Tiamina	0.00002
Glicina	0.65	D(-) fructosa	0.4
L-histidina	2.50	Acido fumárico libre	0.06
L-isoleucina	0.05	D(+) glucosa	0.7
L-leucina	0.08	Acido $\alpha$ -cetoglutámico	0.37
L-lisina HCl	0.63	Hidrolizado de lactoalbúmina	3.3
L-metionina	0.05	Acido L(-)-málico libre	0.67
L-fenilalanina	0.15	Acido succínico	0.06
L-prolina	0.35	Sacarosa	26.68
DL-serina	1.10	Extracto de levadura	3.33
L-treonina	0.18		



### 4.3 Cultivos estáticos

Los cultivos estáticos se realizaron en frascos T de 75 cm<sup>2</sup> (Costar 3375) (ver **Figura 4.1**). En los cultivos adicionados con amonio se utilizó cloruro de amonio (Sigma A-0171) y en los adicionados con lactato, ácido L[+]-láctico (Sigma L-4388). Las células se despegaron de los frascos por medio del flujo de un pipeta de 10 mL, hasta que virtualmente ninguna célula permanecía adherida al frasco. Este procedimiento se realizó cada vez que era necesario tomar una muestra o para subcultivar.

### 4.4 Cultivos en suspensión

#### 4.4.1 Cultivos en frasco agitado

Estos cultivos se realizaron en frascos agitados (ver **Figura 4.1**) de 100 mL. Se utilizó un volumen de trabajo de 60 mL. Los cultivos se mantuvieron a 27° C y a una agitación de 100 rpm, utilizando un agitador de barra magnética suspendido a 0.3 cm del fondo del frasco. En el experimento con lactato como única fuente de carbono se elaboró el medio de cultivo a partir de los reactivos individuales con la formulación de la **Tabla 4.1**, excepto glucosa. Se agregó glucosa (0.7 g/L) o lactato.

#### 4.4.2 Cultivos en biorreactor instrumentado

##### 4.4.2.1 El biorreactor

En la **Figura 4.2** se muestra un diagrama del biorreactor instrumentado utilizado en este trabajo. Los cultivos se realizaron en una jarra de 1.7 L con un volumen de trabajo de 700 mL. Para solucionar el problema de transferencia de masa se utilizaron dos impulsores: Una barra magnética suspendida con un diámetro del 43% el diámetro de la jarra a 2 cm del fondo y un impulsor de cuatro paletas planas con un diámetro del 57% el diámetro de la jarra a 7 cm de la barra magnética, lo que coincide con la superficie del líquido. Al impulsor de cuatro paletas se le colocaron dos ampliaciones de lámina de teflón de 3 cm de largo, con el fin de mejorar la transferencia de oxígeno (ver **Figura 4.3**). Además, el reactor cuenta con dos *baffles* de 1/10 el diámetro del reactor.

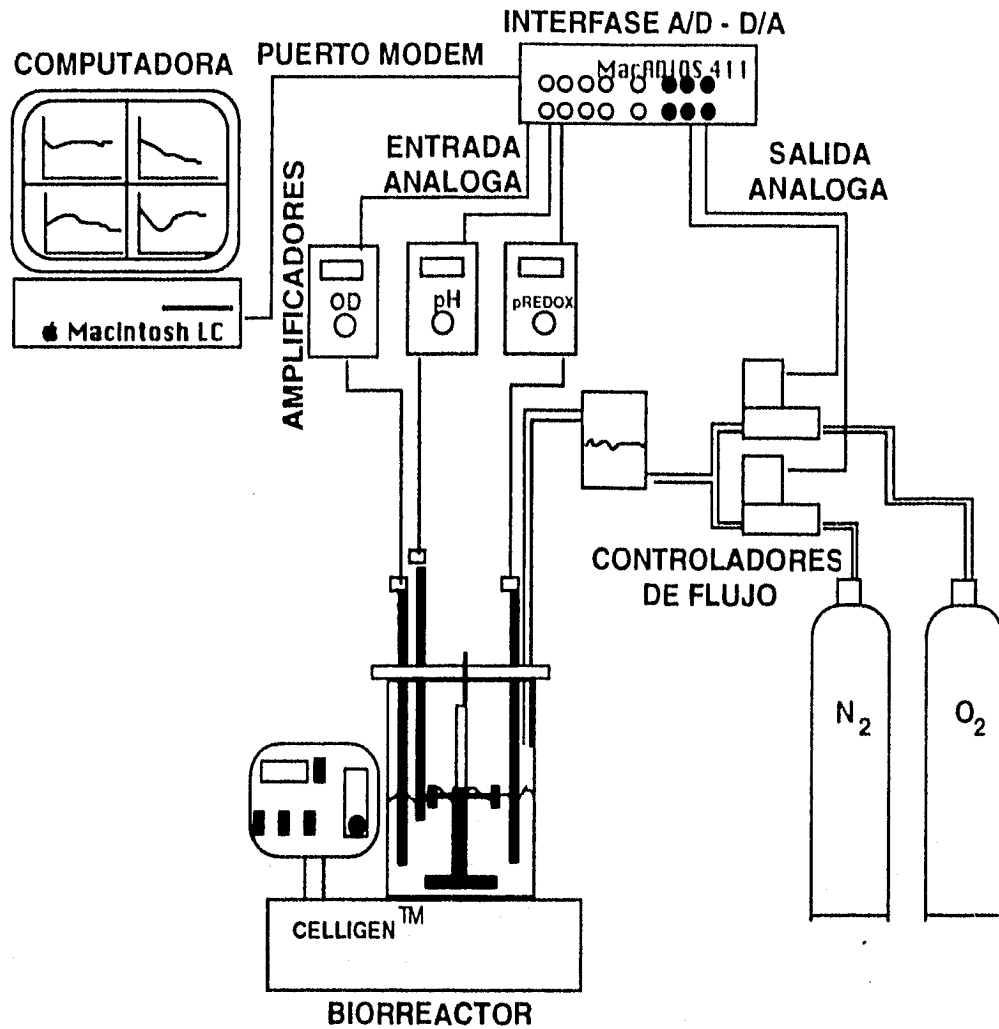
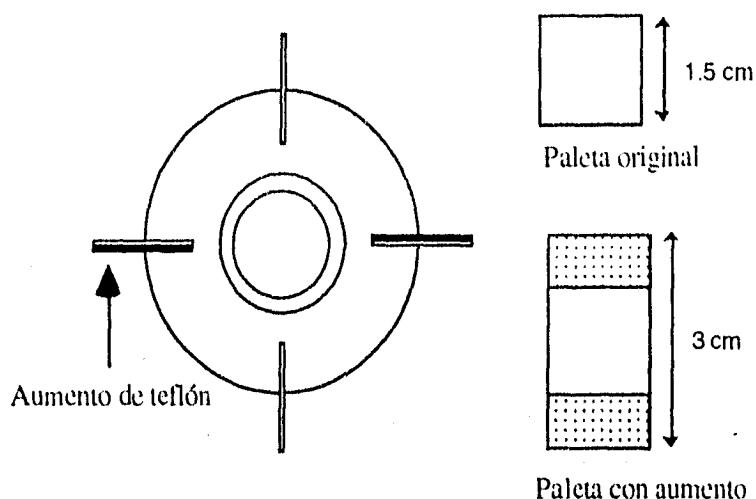


Figura 4.2 Sistema de control y adquisición de datos. Modificado de la referencia 2.

El oxígeno disuelto se midió con un electrodo polarográfico (Ingold Electrodes). Adicionalmente se midió pH y potencial redox (Ingold Electrodes).

El reactor se operó a 27°C y a una velocidad de agitación de 100 rpm. Los controles de temperatura y agitación se efectuaron por un sistema Celligen (New Brunswick Scientific Co.). La tensión de oxígeno disuelto permaneció constante en cada cultivo en el valor preestablecido (0, 2, 5, 10 y 30%) a través del programa de control descrito en la siguiente sección. El flujo total de gases (suministrado a través de cilindros de gases presurizados) se mantuvo en 500

mL/min, excepto en los experimentos a 2 y 5%, donde se mantuvo en 1000 mL/min. En el cultivo en lote a 30% OD se inició con aireación sumergida a 0.43 vvm y 100 rpm. Debido a que esto evitó el crecimiento celular, se cambió a aireación superficial con 500 mL/min y una agitación de 100 rpm. El resto de los cultivos se agitaron a 100 rpm. Como excepción, en el cultivo a 2% se utilizó aire en lugar de oxígeno para lograr mantener el OD constante, ya que el flujo mínimo de los controladores de flujo másico es de 5 mL/min (ver descripción del control de OD en la siguiente sección). En todas las fermentaciones se partió de un inóculo de 200,000 cel/mL. Las células se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min. para eliminar rastros de medio agotado, y asegurarse que todos los cultivos se inocularan en las mismas condiciones (ver sección 4.1).



**Figura 4.3 Impulsor de cuatro paletas modificado.** Se muestra el aumento de teflón que se le hizo al impulsor para aumentar la transferencia de masa.

#### 4.4.2.2 Programa de control y adquisición de datos.

Se utilizó un programa de control escrito en QuickBasic por Aguilar-Aguila et al.<sup>2</sup>. La tensión de oxígeno disuelto se controló en un valor constante y predeterminado a través de la variación de la composición de gases a la entrada (oxígeno y nitrógeno) por medio de un algoritmo de control proporcional, utilizando una ganancia entre 1 y 2 para cultivos con oxígeno y entre 4 y 7 para el cultivo con aire, a lo largo de las distintas condiciones de cultivo. El flujo de gases se controló con dos controladores de flujo másico 5850E (Brooks Instruments), uno para

oxígeno/aire y uno para nitrógeno (cada uno de ellos con una capacidad de 0-1000 mL/min)(ver **Figura 4.2**).

La adquisición de los valores de oxígeno disuelto, composición de gases a la entrada, pH y potencial redox se realizó cada 300 seg por una computadora Macintosh LC a través de una tarjeta MacADIOS 411 (GW Instruments) equipada con convertidores analógicos/digitales y digitales/analógicos, así como con entradas y salidas digitales<sup>27</sup>. En la **Figura 4.2** se muestra un diagrama de este sistema.

## **4.5 Métodos Analíticos**

### **4.5.1 Determinación de concentración, viabilidad y tamaño celular.**

En los cultivos en suspensión, la concentración y el tamaño celular se determinaron utilizando un contador de partículas Coulter (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics) con un tubo de apertura de 100  $\mu$ m y utilizando solución isotónica Isoton II (Coulter, 7546719) para diluir las muestras. La viabilidad se determinó con la técnica de exclusión de azul de tripano en un hematocitómetro. Para los cultivos estáticos, la concentración y la viabilidad celular se determinaron en un hematocitómetro, en vez del contador Coulter, ya que solo se disponía de bajos volúmenes de muestra.

### **4.5.2 Determinación de glucosa, sacarosa y lactato**

La glucosa, sacarosa y lactato se determinaron enzimáticamente con un analizador bioquímico YSI modelo 2700 (Yellow Spring Instruments). El analizador cuenta con membranas con enzimas inmovilizadas (glucosa oxidasa y L-lactato oxidasa) para determinar glucosa y lactato. Las enzimas catalizan la reacción entre la muestra y el oxígeno para formar un derivado y peróxido de hidrógeno. La sonda del sensor contienen un sistema de electrodos amperométricos que responden ante la presencia del peróxido. El flujo de corriente en el circuito del ánodo de platino es linealmente proporcional a la concentración de glucosa y de lactato. La sacarosa se cuantificó transformandola a glucosa y fructosa por medio de la enzima  $\beta$ -fructosidasa (Boehringer Mannheim, No. cat. 104914). Posteriormente se determinó la concentración de glucosa final en el YSI (glucosa presente en la muestra más la glucosa formada

por la inversión de la sacarosa) y se restó la concentración de glucosa presente originalmente en la muestra. La concentración de sacarosa es estequiométricamente proporcional a la concentración de glucosa formada.

#### **4.5.3 Determinación de fructosa**

Para determinar fructosa se utilizó el "kit" No. 716260 de Boehringer Mannheim. El ensayo consiste en la fosforilación de la fructosa por la hexoquinasa. Posteriormente, la fosfoglicosa isomerasa convierte la fructosa-6-fosfato en glucosa 6 fosfato. La glucosa-6-fosfato reacciona con NADP para formar gluconato-6-fosfato y NADPH. El NADPH formado es estequiométricamente proporcional a la cantidad de fructosa. El NADPH se cuantificó por su absorbancia a 340 nm.

#### **4.5.4 Determinación de aminoácidos**

Se utilizó un analizador de aminoácidos Beckman modelo 6300. El método incluye una cromatografía de líquidos por intercambio iónico. Se utilizó una columna sencilla (10 cm High performance column for lithium buffer methods No. 338051, Beckman). Se usan cuatro buffers de litio, ninhidrina y un regenerante de hidróxido de litio. Los componentes de la muestra eluyen de acuerdo a su carga y al buffer de litio utilizado para su elución<sup>27</sup>. Un detector determina la absorbancia de los componentes ninhidrina positivos a 570 y 440 nm. Las concentraciones de aminoácidos y amonio se determinan usando curvas patrón realizadas por Higareda<sup>27</sup>. Estas curvas fueron obtenidas en las mismas condiciones y utilizando el mismo equipo que los utilizados en este trabajo.

**Las muestras se prepararon de la siguiente manera<sup>63</sup>:**

- 1. Agregar a la muestra 6  $\mu$ L de HCl 2N para evitar la desorción de amonio y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.**
- 2. Colocar 80  $\mu$ L de muestra a temperatura ambiente y agregar 180  $\mu$ L de ácido 5-sulfosalicílico al 35% para precipitar la proteína.**
- 3. Mezclar en vortex 5 seg y dejar reposar 5 min a temperatura ambiente.**
- 4. Adicionar 140  $\mu$ L de hidróxido de litio 0.5M para neutralizar y mezclar en vortex.**

5. Centrifugar a 4000 rpm durante 15 min y separar el sobrenadante. Repetir este paso hasta que el sobrenadante este perfectamente claro. Se puede guardar el preparado hasta 24 h para su análisis.

6. Tomar 50  $\mu\text{L}$  del preparado y agregar 450  $\mu\text{L}$  de buffer Li-S que contenga un control interno. Se utilizó ácido glucosamínico (0.4 mg/L) y/o ácido L- $\alpha$  aminoadípico (3.6 mg/L).

7. Mezclar con vortex e inyectar 50  $\mu\text{L}$  en el analizador de aminoácidos Beckman.

Cada diez muestras se intercaló un estándar con aminoácidos y amonio (Beckman, 338088) para verificar el funcionamiento del equipo y la cuantificación de los componentes. La función de los estándares internos es permitir corregir posibles errores en el volumen inyectado al analizador.

## 4.6 Consideraciones matemáticas

### 4.6.1 Cálculo de parámetros cinéticos del cultivo

El crecimiento de células de insecto sigue el modelo de Monod, en donde:

$$\frac{dX_T}{dt} = \mu X_v \quad 4.1$$

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento real,  $t$  es el tiempo,  $X_T$  es la concentración celular total y  $X_v$  es la concentración celular viable. La velocidad de crecimiento aparente,  $\mu_{ap}$  es el resultado de la diferencia entre la velocidad de crecimiento real y la velocidad de muerte. La  $\mu_{ap}$  esta dada por:

$$\mu_{ap} = \mu - kd \quad 4.2$$

donde  $kd$  es la velocidad específica de muerte. De tal forma la cinética de crecimiento se puede expresar también como:

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu_{ap} X_v \quad 4.3$$

Integrando la ecuación 4.3 se obtiene:

$$\ln \left[ \frac{X_v}{X_{v_0}} \right] = \mu_{ap} (t - t_0) \quad 4.4$$

En donde  $X_v$  es la concentración de células viables al tiempo  $t$ , y  $X_{v_0}$  es la concentración celular viable al inicio de la fase exponencial. La velocidad de crecimiento es constante durante la fase exponencial de crecimiento. A partir de la pendiente de la recta formada por la gráfica de  $\ln(X_v/X_{v_0})$  contra tiempo se obtiene la velocidad específica aparente de crecimiento. La velocidad de crecimiento reportada en este trabajo es la velocidad de crecimiento aparente ( $\mu_{ap}$ ) y se indica a lo largo del texto como simplemente velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

Los coeficientes metabólicos,  $q_i$ , y el rendimiento aparente se calcularon con la siguiente ecuación<sup>52</sup>:

$$\frac{-dS_i}{dt} = q_i X_v \quad 4.5$$

donde  $S_i$  es la concentración del carbohidrato, aminoácido o amonio, y  $q_i$  es el coeficiente metabólico (o consumo específico del nutrimento "i", o producción específica del producto "i"). En la fase de crecimiento exponencial, donde se pueden considerar a los coeficientes metabólicos como constantes, la ecuación 4.5 se integra para dar:

$$S_i = \frac{-q_i}{\mu_{ap}} (X_v - X_{v_0}) + S_{i_0} \quad 4.6$$

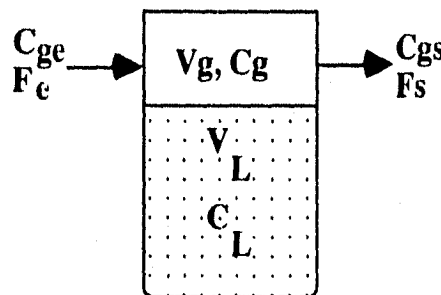
Por lo tanto, conociendo  $\mu_{ap}$ , se puede obtener el coeficiente metabólico de la pendiente de una curva de  $X_v - X_{v_0}$  contra  $S_i$ . El rendimiento aparente,  $Y_{ap}$ , estará dado por el inverso de tal pendiente, es decir,  $Y_{ap} = \mu/q_i$ . En algunos casos el coeficiente metabólico no fue constante, por lo que no se reporta  $q_i$  y  $Y_{ap}$ .

#### 4.6.2 Cálculo en línea de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO).

En la Figura 4.4 se muestra un diagrama esquemático de una fermentación lote. Haciendo un balance de oxígeno en la fase líquida para este reactor:

$$\frac{dC_l}{dt} = k_L a [C^* - C_l] - [qO_2 X_v] \quad 4.7$$

donde  $C_l$  es la concentración de oxígeno en el líquido,  $V_l$  es el volumen del líquido,  $C^*$  es la concentración de oxígeno a la saturación del líquido,  $k_L a$  es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, y  $qO_2$  es la velocidad específica de consumo de oxígeno. El término  $qO_2 X_v$  corresponde a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO).



**Figura 4.4 Diagrama esquemático de una fermentación lote.** Donde  $C_g$  es igual a la concentración de oxígeno en la fase gaseosa,  $F$  es igual al flujo de gases,  $V$  es igual al volumen del reactor.

$C_l$  se obtiene a partir del electrodo de oxígeno disuelto sumergido en el cultivo.  $C^*$  se obtiene a partir de la consideración de que la concentración de oxígeno en la fase gaseosa a la entrada, en el reactor y a la salida son iguales. Esta consideración se basa en la suposición de que la fase gaseosa en el reactor esta bien mezclada, y que el consumo de oxígeno es mucho menor que el flujo de gases en el reactor, por lo que es despreciable. Esta suposición es válida, ya que el consumo de oxígeno de las células de insecto es menor a  $4 \times 10^{-10}$  mmol/cel h, como



se verá en la sección 5.6, lo que provoca una diferencia entre la entrada y la salida del reactor menor del 0.5% en estado estacionario, si se mantiene una relación de flujo de oxígeno a espacio vacío del reactor mayor a  $0.1 \text{ min}^{-1}$ . A partir de medidores de flujo másico, se conoce la fracción mol de oxígeno a la entrada del reactor, con lo que se calcula la presión parcial de oxígeno. En estas condiciones, y conociendo la constante de Henry y la concentración molar del agua, se determina  $C^*$  con la siguiente ecuación:

$$C^* = \frac{C_{H_2O} P_{O_2}}{H} \quad 4.8$$

Para calcular el  $k_L a$  se utilizó el método de respuesta del sistema a un cambio escalonado. El  $k_L a$  es igual al inverso de la constante de tiempo de un sistema de primer orden. La constante de tiempo es igual al tiempo que tarda el sistema en alcanzar el 62.3% de la respuesta después de un cambio escalonado. El  $k_L a$  obtenido fue de  $2.39 \text{ h}^{-1}$ . Para comprobar que no hubo variación del  $k_L a$  durante los cultivos, se repitió la medición después de la fermentación, lo que resultó en  $2.32 \text{ h}^{-1}$ . Esto indica que solamente hubo una variación menor al 3% en el transcurso del cultivo.

Discretizando la ecuación 4.7, y reordenando, se obtiene la siguiente expresión:

$$VCO = k_L a \left[ \frac{(C_i^* + C_{i+1}^*) - (C_{i,t} + C_{i+1,t})}{2} \right] - \left[ \frac{C_{i+1,t} - C_{i,t}}{t_{i+1} - t_i} \right] \quad 4.9$$

donde  $i$  es el elemento de discretización. Con la ecuación 4.9 que se determinó la velocidad de consumo de oxígeno en línea.

## Capítulo V

# Resultados y Discusión

### 5.1 Estrategia de experimentación

Con el fin de lograr los objetivos planteados en el capítulo 3 se siguió la estrategia experimental planteada a continuación. En negrillas se muestra el inciso en el que se reportan los resultados de cada punto.

- Caracterización del crecimiento y del consumo o producción de nutrimentos en cultivo estático (5.3), en cultivo en suspensión en frascos agitados (5.4.1) y en biorreactores instrumentados (5.4.2). Con el fin de eliminar el efecto de la descomposición espontánea de los aminoácidos, especialmente glutamina, se determinaron coeficientes para cuantificar esta degradación espontánea. Esta información se consideró para conocer el consumo real de los aminoácidos por los cultivos de células de insecto (5.2).
- Determinación del efecto de los metabolitos tóxicos amonio (5.3.2) y lactato (5.3.3) en el crecimiento y en el consumo de nutrimentos de células de insecto.
- Determinar el requerimiento de suero fetal bovino (5.3.4) y de oxígeno de las células de insecto (5.6).
- Utilizar toda esta información para establecer estrategias computarizadas de alimentación de nutrimentos con base en la velocidad de consumo de oxígeno (5.7).

### 5.2 Estabilidad del medio de cultivo

Algunos aminoácidos se descomponen espontáneamente en las condiciones de cultivo de las células de insecto. Además de esta descomposición espontánea, el suero fetal bovino contiene enzimas, como la glutaminasa, que provocan degradación enzimática<sup>50</sup>. Con el fin de

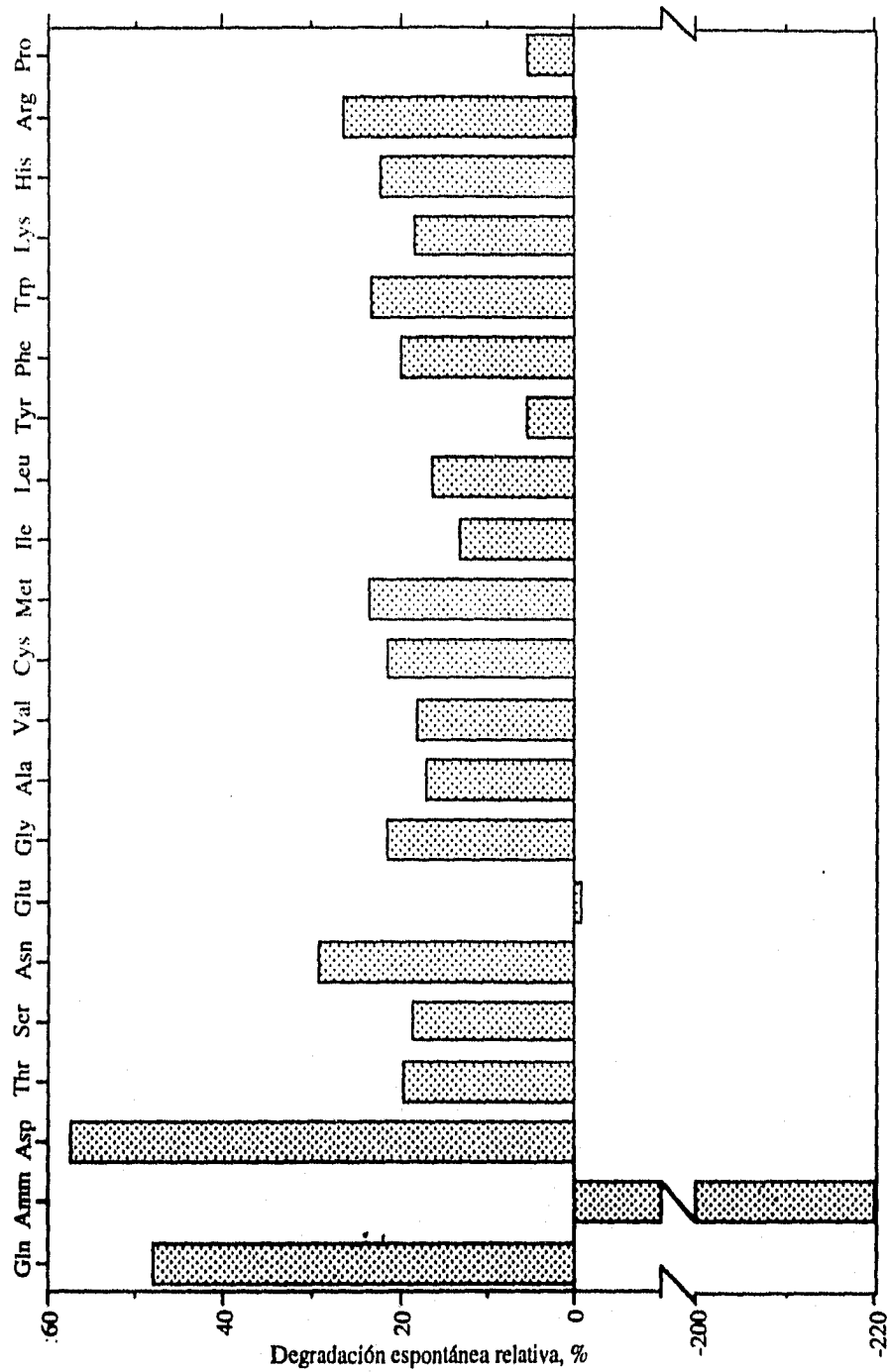
diferenciar eventos metabólicos de la descomposición espontánea y enzimática (de aquí en adelante llamadas simplemente "descomposición espontánea") de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo, se analizó periódicamente la composición de aminoácidos en medio sin células en condiciones de cultivo celular (en frascos T a 27°C con pH inicial de 6.2 y 10% de suero fetal bovino). En la **Figura 5.1** se muestra la degradación espontánea de los aminoácidos y la generación de amonio. Cabe señalar que en todo el trabajo la abreviatura Cys se refiere al dímero de cisteína, es decir, la cistina. En el **Apéndice I** se encuentran las cinéticas completas de la degradación espontánea de todos los aminoácidos.

Arbitrariamente, se clasificaron como aminoácidos "estables" aquellos que se degradan espontáneamente en menos del 20% en 450 h, y los que se degradan espontáneamente más del 20% fueron clasificados como "inestables". En el **Apéndice I** se reportan los valores de concentración promedio y desviación estándar a lo largo de las 450 h para los aminoácidos estables. Para los aminoácidos inestables, se supuso una cinética de descomposición de primer orden:

$$\frac{dS_i}{dt} = -kS_i \quad 5.1$$

donde  $k$  es la constante específica de degradación. Integrando la ecuación 5.1 se puede obtener la constante específica de degradación de cada aminoácido de la pendiente de  $\ln(S/S_0)$  contra el tiempo. En la **Tabla 5.1** se listan los aminoácidos inestables y su correspondiente constante de degradación.

La glutamina y el ácido aspártico son los que más se degradan espontáneamente. La glutamina es el aminoácido más lábil, y su degradación es especialmente importante ya que lleva a la producción de amonio (**Figura 5.2**). Ozturk y Palsson<sup>50</sup> mostraron cómo la constante de degradación espontánea de la glutamina disminuye conforme disminuye el pH. Un aumento en la temperatura también disminuye esta constante. En este trabajo se obtiene una constante de  $1.15 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , comparado con la constante de  $2.17 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  que obtienen Ozturk y Palsson<sup>50</sup> a pH de 7.4 y a 37°C en medio DMEM. La descomposición espontánea de la glutamina genera el 81% del amonio generado en el medio de cultivo, mientras que la descomposición espontánea del resto de los aminoácidos solo genera el 19.2% del amonio. Cabe señalar que los niveles de amonio generados por la descomposición espontánea de la glutamina no alcanzan niveles tóxicos para las células, como se verá en la sección 5.3.2. Sin embargo, Gooche y Monica<sup>21</sup>,



**Figura 5.1** Degradación espontánea relativa de aminoácidos del medio de cultivo después de 450 h a 27°C. Valores negativos se refieren a producción. La abreviatura "Cys" se refiere a cistina.

Dyken y Sambanis<sup>17</sup>, y Cacciuttolo et al.<sup>8</sup> han reportado inhibición en la expresión/procesado de proteínas por concentraciones de amonio que no son tóxicas para el crecimiento celular. Por lo tanto, no se debe descartar que estos niveles de amonio puedan afectar la fase de producción de proteína recombinante.

Tabla 5.1 Aminoácidos inestables y su constante específica de degradación

Aminoácido	k (h <sup>-1</sup> )x 10 <sup>3</sup>
Gln	1.15
Asp	0.60
Arg	0.42
His	0.28
Met	0.18
Asn	0.16
Trp	0.12
Cys*	0.09
Phe	0.06

\*La abreviatura Cys se refiere a cistina.

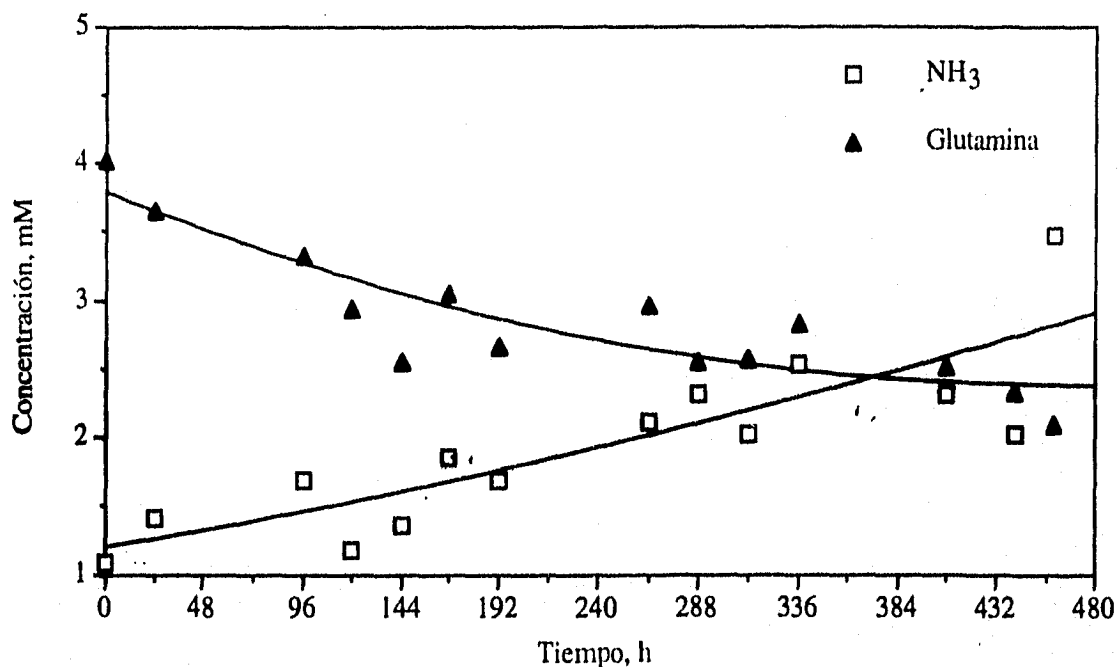


Figura 5.2 Degradación espontánea de la glutamina y producción de amonio

## 5.3 Cultivos estáticos

### 5.3.1 Caracterización

El cultivo estático sigue siendo el método preferido para producir proteínas por técnicas de ADN recombinante a pequeña escala. El cultivo estático se caracteriza por una transferencia de oxígeno deficiente, ya que esta se lleva a cabo exclusivamente por difusión. Además, las células de insecto se adhieren al fondo del frasco (ver **Figura 4.1**), lo que dificulta aún más el proveerlas de oxígeno. La capacidad de las células de adherirse a la pared de los frascos provoca daño celular y variación experimental, ya que es necesario desprender las células cada vez que se toma una muestra. En la **Figura 5.3** se muestra una cinética típica de crecimiento de las células de insecto en estas condiciones, mientras que en el **Apéndice II** se muestran otras cinéticas de cultivos en las mismas condiciones. Durante la fase de crecimiento exponencial, la glucosa es la principal fuente de carbono. El lactato se produce seguramente como consecuencia de la falta de oxígeno en estos cultivos. Las células utilizan principalmente la glucólisis como ruta para la generación de energía y se producen 1.35 moles de lactato por cada mol de glucosa consumida por las células. Este aspecto se discutirá más ampliamente en la **sección 5.6**. Asimismo, la fructosa se consume a partir de que la glucosa llega a niveles inferiores de 0.2 g/L. Cuando la glucosa se encuentra en valores menores de 0.1 g/L y la concentración celular se encuentra en aproximadamente  $1 \times 10^6$  cel/mL, hay una nueva fase de adaptación seguida por una nueva fase de crecimiento exponencial, en donde las células utilizan el lactato como principal fuente de carbono. Esto concuerda con lo reportado por Bédard et al.<sup>5</sup>, que observaron consumo de lactato hasta su agotamiento en la fase estacionaria del cultivo.

En la **Tabla 5.2** se muestra la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima en estos cultivos antes del agotamiento de la glucosa, y durante la fase de consumo de lactato. En la literatura no están reportados estos valores para cultivos estáticos.

**Tabla 5.2 Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular máxima en cultivos estáticos (media y desviación estándar de tres cultivos)**

<b>Velocidad de crecimiento</b> <b>h<sup>-1</sup></b>	Antes del agotamiento de glucosa	0.014 +/-0.0006
	Durante el consumo de lactato	0.012 +/-0.001
<b>Xv máxima</b> <b>x10<sup>6</sup> cel/mL</b>	Antes del agotamiento de glucosa	0.806 +/-0.118
	Durante el consumo de lactato	1.240 +/-0.135

Xv significa concentración celular viable.

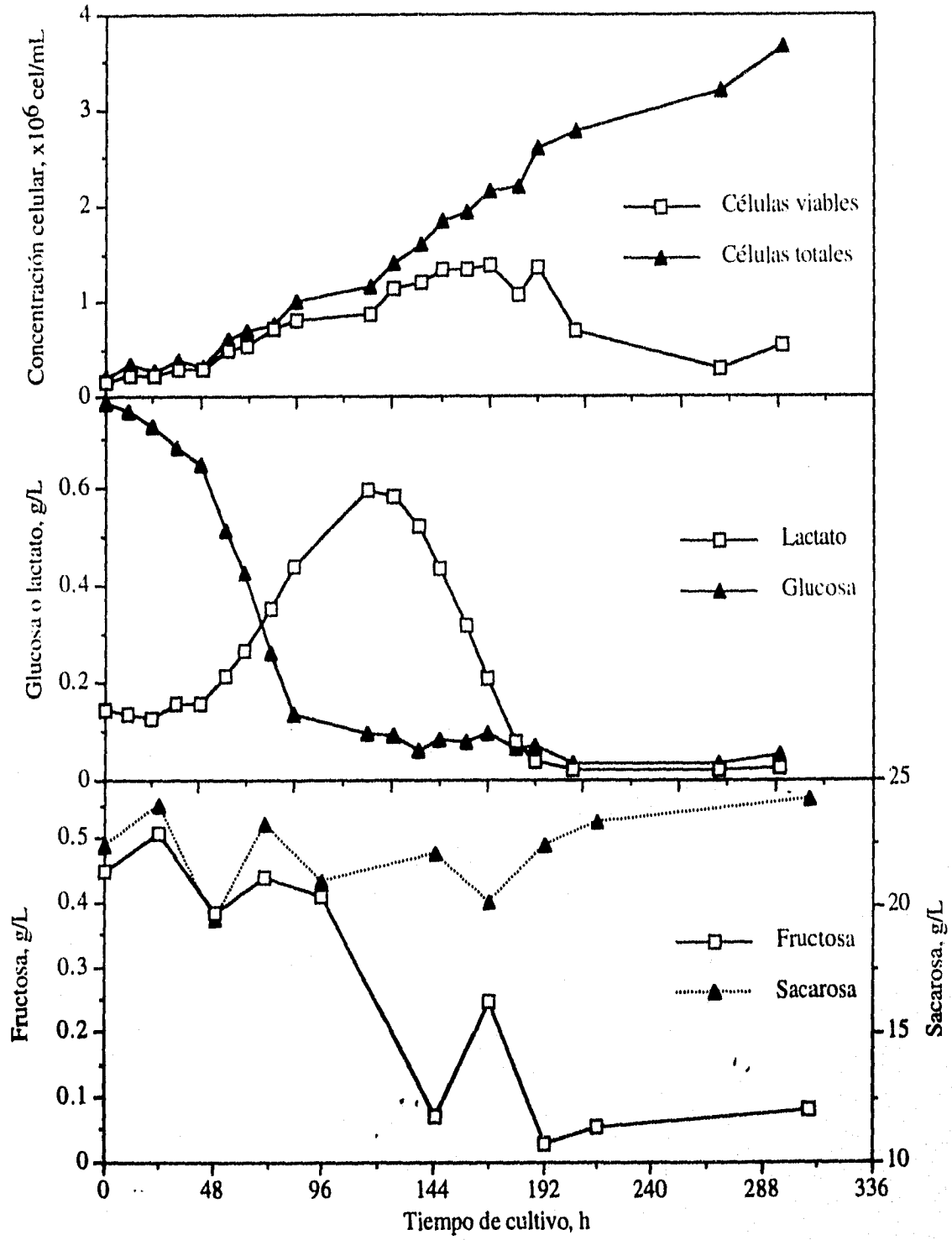


Figura 5.3 Cinética de crecimiento y consumo de carbohidratos en cultivo estático

El consumo de aminoácidos se puede dividir en tres fases según la fuente de carbono utilizada por la célula. En la **Figura 5.4** se muestra una cinética típica de consumo de aminoácidos en cultivo estático. Debido a la disponibilidad del analizador de aminoácidos, solo se analizaron los aminoácidos para uno de los cultivos estáticos. Ya que se observó poca variación entre los cultivos, se puede considerar que el perfil de consumo o producción en otros cultivos estáticos es similar. En la primera fase, la glucosa es la principal fuente de carbono. Todos los aminoácidos se consumen, incluyendo la alanina que generalmente se produce. En la **Figura 5.4** se puede observar también que hay un consumo inicial de amonio y su producción inicia a partir del agotamiento de la glucosa. Stravoulakis et al.<sup>65</sup> y Wang et al.<sup>70</sup> reportaron un comportamiento similar, en el que atribuyen el consumo de amonio a la reacción de aminación del  $\alpha$ -oxoglutamato, reacción fundamental para la síntesis de los aminoácidos. En el **Apéndice II** se muestra el coeficiente metabólico y el rendimiento aparente de todos los aminoácidos en esta etapa y al final del cultivo. Al final de la primera etapa la concentración de todos los aminoácidos, excepto glutamina y asparagina aumenta. La razón de este aumento se desconoce.

En la segunda etapa, donde el lactato es la principal fuente de carbono, hay consumo principalmente de glutamina y cistina y producción de alanina, mientras que la concentración del resto de los aminoácidos permanece prácticamente constante. En la tercera etapa, o fase de muerte, la concentración de aminoácidos aumenta debido a su liberación al medio de cultivo por las células muertas, o por la hidrólisis de proteínas presentes en el medio. Sin embargo, no hay un aumento en la concentración de glutamina y metionina. Esto señala que estos aminoácidos no estaban presentes en las células lisadas, o eran rápidamente consumidos por las células viables en el cultivo.

En la **Figura 5.5** se muestra el consumo relativo de los aminoácidos al agotamiento de glucosa y al final del cultivo. En estos cálculos se ha tomado en cuenta la degradación espontánea de los aminoácidos que fueron considerados como inestables en la **sección 5.1**. Para calcular esta degradación se utilizó la ecuación 5.1 y las constantes reportadas en la **Tabla 5.1**. Ya que la concentración de los aminoácidos varía con el tiempo, se utilizó la mayor concentración a lo largo del cultivo como la concentración inicial  $S_i$  para el cálculo de la degradación espontánea. Esto da como resultado que los consumos o producciones estén ligeramente subestimados. En el caso de aminoácidos consumidos, la altura total de las columnas corresponde a la desaparición del aminoácido. La sección de la columna en negro corresponde a la degradación espontánea, y el resto de la columna corresponde al consumo real del aminoácido. Los valores negativos se refieren a producción. En este caso, la columna rayada



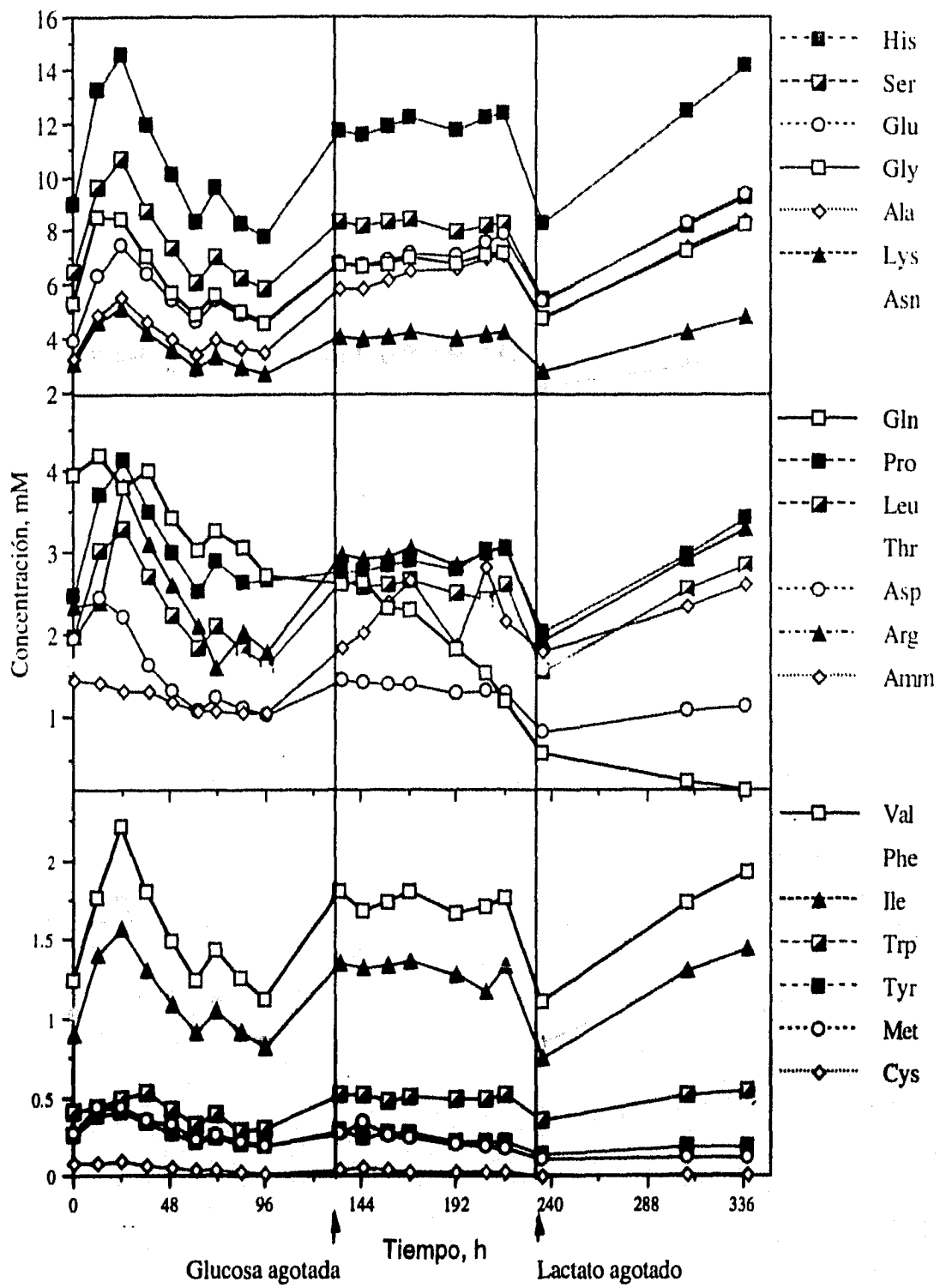
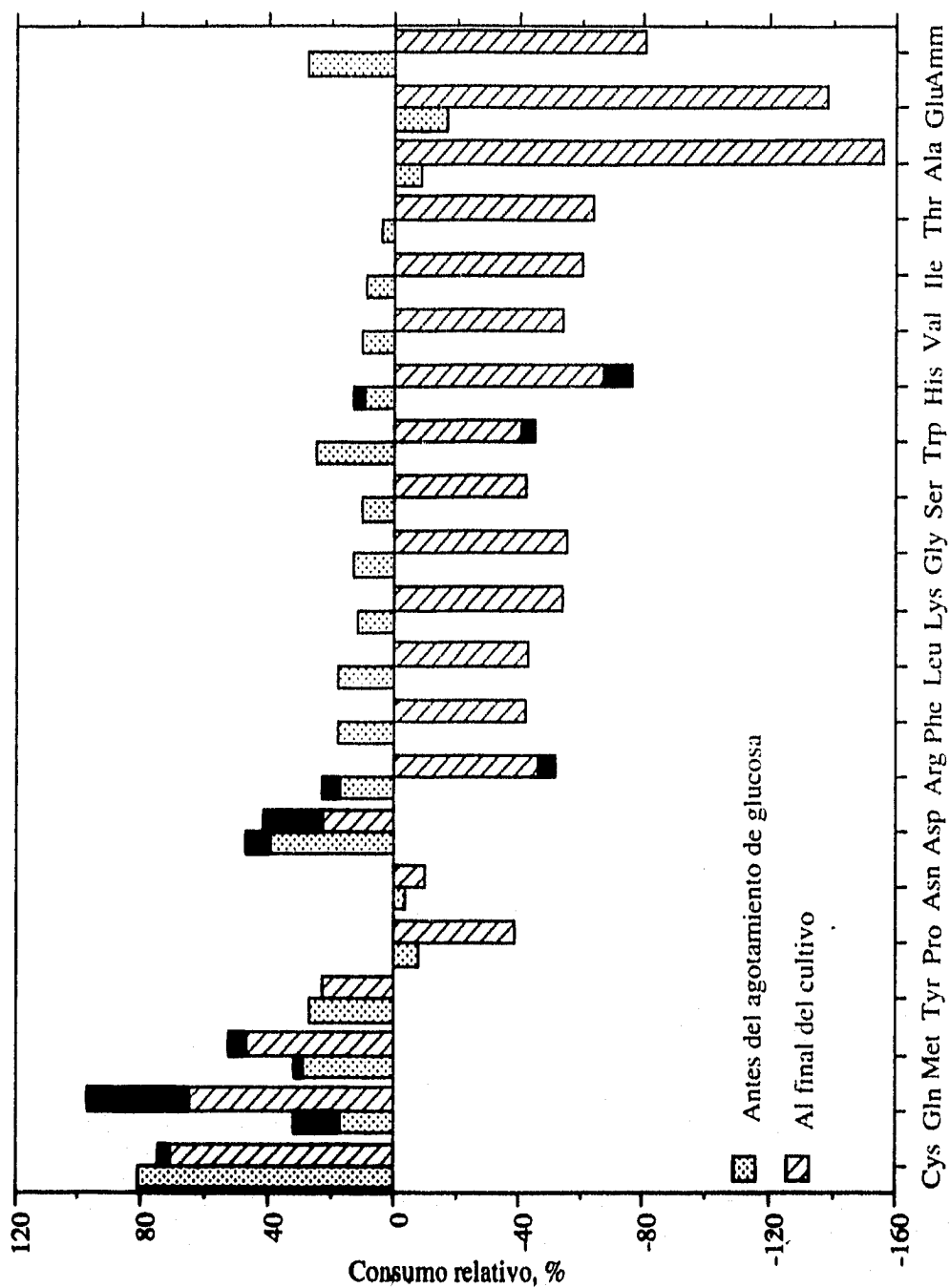


Figura 5.4 Cinética de consumo y/o producción de aminoácidos en cultivo estático. La abreviatura "Cys" se refiere a cistina.



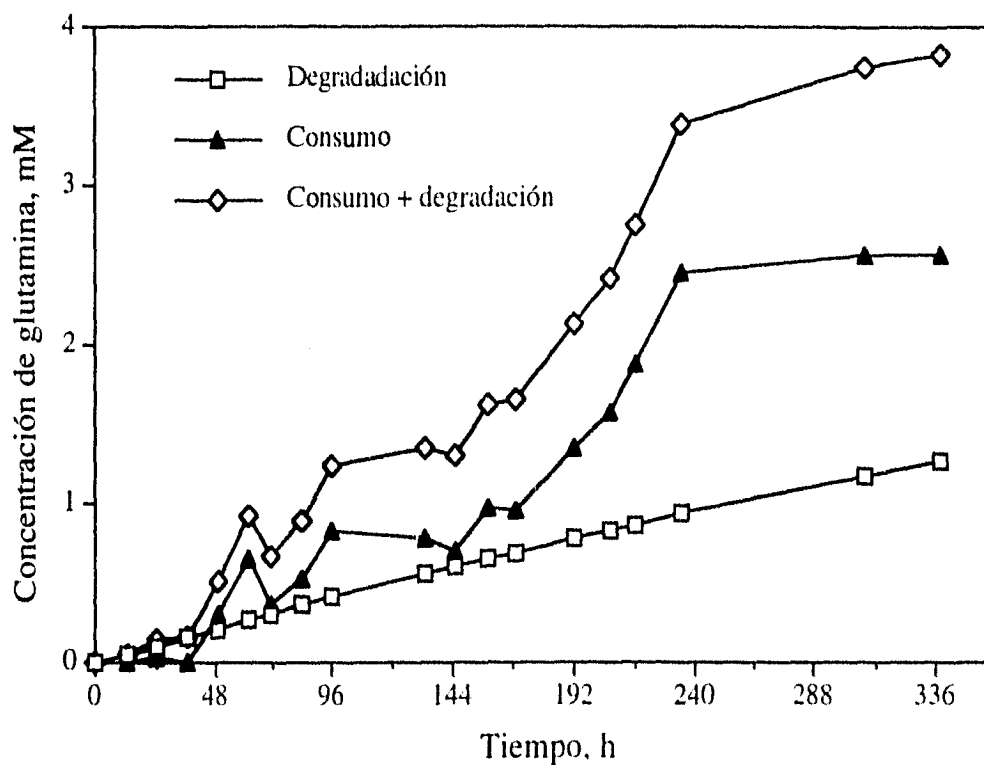
**Figura 5.5 Consumo relativo de aminoácidos en cultivo estático.** El agotamiento de glucosa ocurre a las 133.25 horas de cultivo. En el caso de aminoácidos consumidos, la altura total de las columnas corresponde a la desaparición del aminoácido. La sección de la columna en negro corresponde a la degradación espontánea, y el resto de la columna corresponde al consumo del aminoácido. Los valores negativos se refieren a producción. En este caso, la columna rayada se refiere a la concentración medida del aminoácido, y la barra negra corresponde a la concentración que se calcula se degradó espontáneamente.

se refiere a la concentración medida del aminoácido y la barra negra corresponde a la concentración que se calcula se degradó espontáneamente.

Antes del agotamiento de glucosa la degradación espontánea de los aminoácidos inestables fue menor al 5%, excepto en el caso del ácido aspártico (7.79 %), asparagina (5.58 %) y glutamina (14.11 %). Al final del cultivo, solo el ácido aspártico (18.54 %), la asparagina (9.01%) y la glutamina (32.11%) se degradaron en más de un 6%. Vale la pena recalcar que el tiempo de cultivo en los frascos T fue mayor que el tiempo promedio para cultivos en suspensión, 215 horas. Ya que la mayoría de los aminoácidos se degradan en menos de un 5 %, se decidió desprestigiar esta degradación espontánea, excepto para el caso de la glutamina. En la **Figura 5.6** se muestra la curva de degradación, consumo y desaparición total (consumo más degradación) de la concentración de glutamina. El coeficiente metabólico para glutamina antes del agotamiento de la glucosa (eliminado la degradación espontánea) es de  $42.7 \mu\text{mol}/\times 10^9 \text{cel h}$ , y el rendimiento es de  $0.39 \times 10^9 \text{cel}/\text{mmol}$ , y durante la fase de consumo del lactato, el coeficiente metabólico es de  $68.85 \mu\text{mol}/\times 10^9 \text{cel h}$  y el rendimiento de  $1.089 \times 10^9 \text{cel}/\text{mmol}$ . En todos los cálculos siguientes se aplicará la corrección por degradación espontánea de la glutamina.

Al agotamiento de glucosa, la cistina es el aminoácido de mayor consumo ( 81.7 %). Ya que la cistina no puede ser sintetizada por las células<sup>43, 66</sup> se considera como un aminoácido clave para el cultivo de células de insecto. Después de la cistina, el aminoácido de mayor consumo es el ácido aspártico, con un consumo del 56.9%. La metionina se consume en un 31.3% y la glutamina en un 17.19%. Estos aminoácidos pueden ser considerados como los más importantes. El ácido aspártico no es esencial para las células de insectos, pero la cistina, metionina y glutamina sí lo son. En esta fase del cultivo, se producen ácido glutámico, alanina, prolina y asparagina. El amonio se consume, probablemente debido a los mecanismos explicados anteriormente.

**Al final del cultivo, solo la cistina, glutamina, metionina, tirosina y el ácido aspártico están en concentraciones menores a las del inicio del cultivo. La concentración de amonio aumenta en un 80 %, comparando con la concentración al inicio del cultivo, aunque se mantiene en concentraciones no tóxicas para las células.**



**Figura 5.6 Consumo y degradación espontánea de la glutamina en cultivo estático.** Consumo y degradación corresponde a la concentración de glutamina total en el medio de cultivo, consumo real se refiere solo a la glutamina consumida por las células.

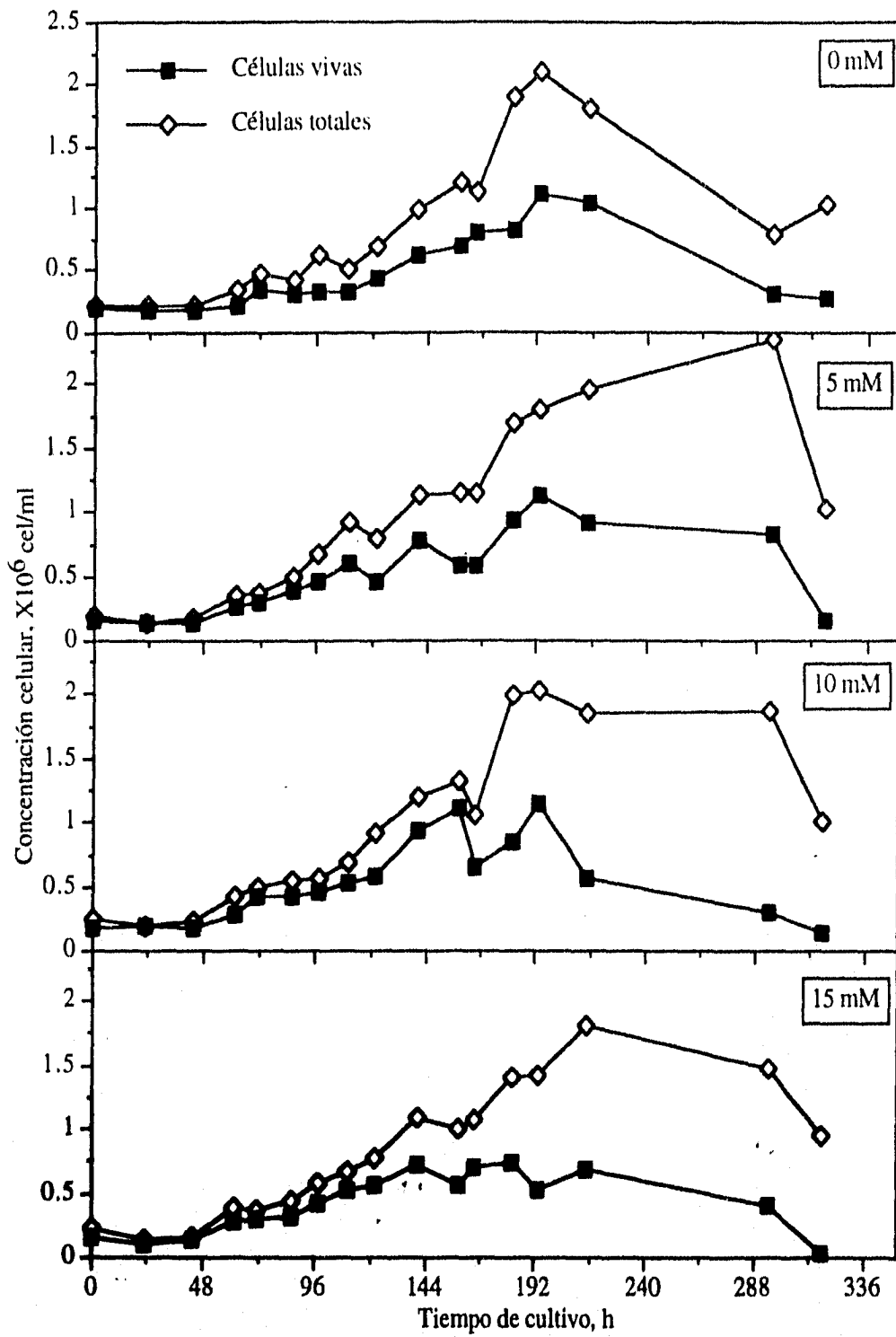
### 5.3.2 Efecto del amonio en el crecimiento celular

Para evaluar el efecto del amonio en el crecimiento celular se realizaron cultivos estáticos en donde se agregaron concentraciones de cloruro de amonio de 0.5, 1, 3, 5, 6, 10 y 15 mM. Algunos de estos experimentos se realizaron por triplicado, como se muestra en la **Figura 5.9**. Se utilizó cloruro de amonio ya que la adición de amoniaco al medio de cultivo alteraría de forma importante el pH. Además, el ion cloruro se encuentra generalmente en altas concentraciones en los cultivos, mientras que otros iones, como el sulfato, son tóxicos para los cultivos (Lena Häggstrom, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suecia; comunicación personal). Para verificar que el cloruro de amonio añadido no afectara el pH del medio de cultivo, se determinó el pH de alícuotas de medio con cloruro de amonio en las mismas concentraciones que para los experimentos. Hubo diferencia de 0.12 unidades de pH entre el testigo y la muestra con 15mM. Esta diferencia no afecta el crecimiento

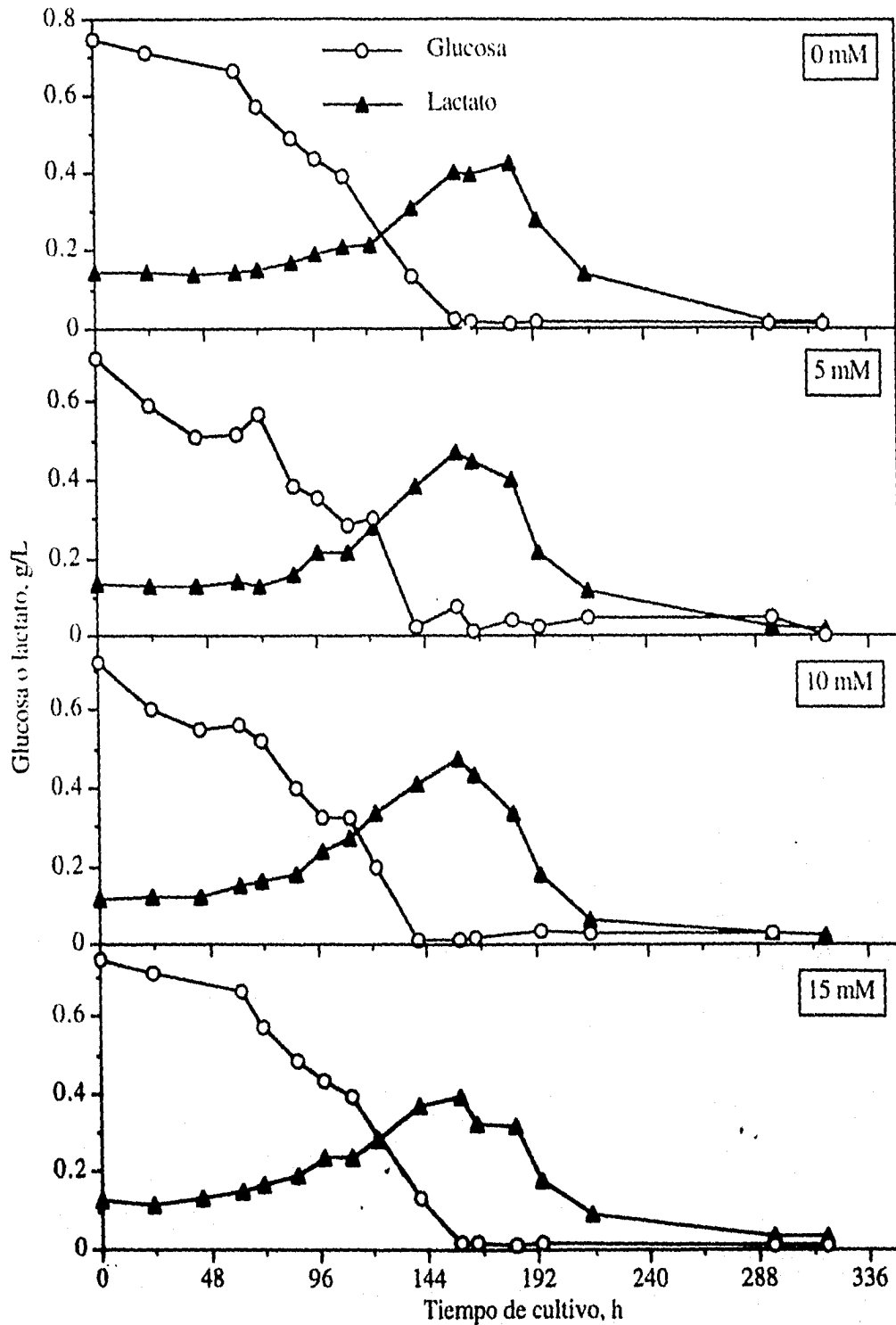
de las células de insecto<sup>33</sup>. En la **Figura 5.7** se observa una comparación entre cinéticas típicas adicionadas con 0, 5, 10 y 15 mM de cloruro de amonio. La fase de crecimiento exponencial duró aproximadamente lo mismo en todos los cultivos. En el cultivo control, la concentración celular total disminuye al terminar la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, en el caso de los cultivos con amonio, la concentración celular aumenta a pesar de que el cultivo se encuentra ya en fase de muerte. Se debe recordar que estos experimentos se realizaron en cultivos estáticos, con la consecuente dificultad de desprender totalmente las células de la pared del frasco. Es probable que la adición de amonio haya cambiado la adherencia de las células, lo que significaría que probablemente no se trata de un aumento de la concentración celular total, sino que las células se desprenden de los frascos solo al final del cultivo, cuando ya no son viables. En la **Figura 5.8** se muestra el consumo de glucosa y la producción/consumo de glucosa por las células a las diferentes concentraciones de amonio. No hubo diferencia en el consumo de glucosa entre los cultivos (ver también el **Apéndice II**). En todos los casos se utilizó el lactato una vez que la concentración de glucosa era casi cero. El lactato se consumió en su totalidad en todos los experimentos.

En la **Figura 5.9** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima. Se muestran las barras de error de los experimentos que se realizaron por triplicado. En este caso, la variación entre los experimentos es muy grande debido a que se trata de cultivos estáticos. Como ya se mencionó, en estos cultivos es necesario desprender las células de los frascos para contarlas. Esto origina diferencias entre las tomas de muestra. Esta alta variabilidad no se ha observado en cultivos en suspensión, como se verá más adelante.

No hubo diferencia en la máxima velocidad específica de crecimiento a las diferentes concentraciones de amonio. La concentración celular viable máxima alcanzada fue mayor en el cultivo con 15 mM de amonio. En la literatura se reporta que no hay un efecto de la concentración de amonio hasta 10 mM<sup>5</sup>, lo que concuerda con nuestros resultados. Aunque exista una disminución de la concentración celular máxima a 15 mM de amonio, es difícil que se llegue a estas concentraciones en cultivo en lote. Sin embargo, concentraciones de amonio mayores se pueden obtener en cultivos con altas concentraciones celulares. En nuestros cultivos hemos encontrado una concentración máxima de amonio de 3 mM. Comparado con los cultivos de hibridomas, en donde el amonio es tóxico a partir de 2 mM<sup>51</sup>, las células de insecto son muy resistentes al amonio. Esta tolerancia al amonio puede deberse más a factores ambientales que a la sensibilidad de la célula en sí. El pH de cultivo de las células de insecto (6.2) es sensiblemente

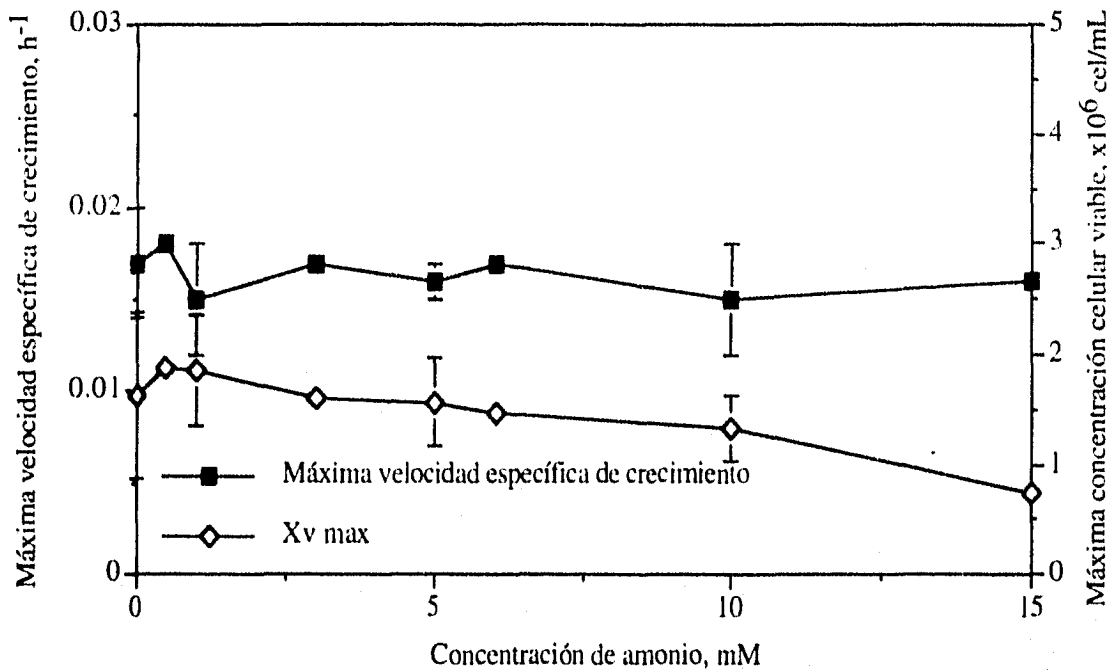


**Figura 5.7** Efecto de la adición de amonio en cinéticas de crecimiento de cultivos estáticos. En el recuadro se muestra la concentración inicial de amonio.



**Figura 5.8** Efecto de la adición de amonio en el consumo de glucosa y consumo o producción de lactato por cultivos estáticos. En el recuadro se muestra la concentración inicial de amonio.

menor que el pH de cultivos de hibridomas (7.2-7.3). Esto provoca que el equilibrio ion amonio-amoniaco se desplace hacia el ion amonio. Varios trabajos han reportado una mayor tolerancia al amonio en cultivos con pH menor<sup>15, 37, 38</sup>. Esto puede deberse a que, aunque el mecanismo de daño por el ion amonio no depende del pH extracelular<sup>38</sup>, el daño por amoniaco disminuye a pH menor, como se mencionó en los antecedentes. Sin embargo, no se debe olvidar el efecto negativo del amonio sobre la expresión y modificación postraduccional de las proteínas, aún en concentraciones no tóxicas para las células<sup>8, 17, 21</sup>. Es necesario, entonces, controlar la concentración de amonio de forma que se mantenga en la menor concentración posible.



**Figura 5.9** Efecto de la adición de amonio en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivo estático. En los experimentos que se realizaron por triplicado se muestra media y desviación estándar. Para el resto de las concentraciones solo se realizó un experimento.

### 5.3.3 Efecto del lactato en el crecimiento celular

El lactato es un metabolito tóxico para las células de mamífero. Con el fin de determinar su efecto sobre el crecimiento de las células de insecto, se realizaron cultivos con 5, 10 y 15 mM de

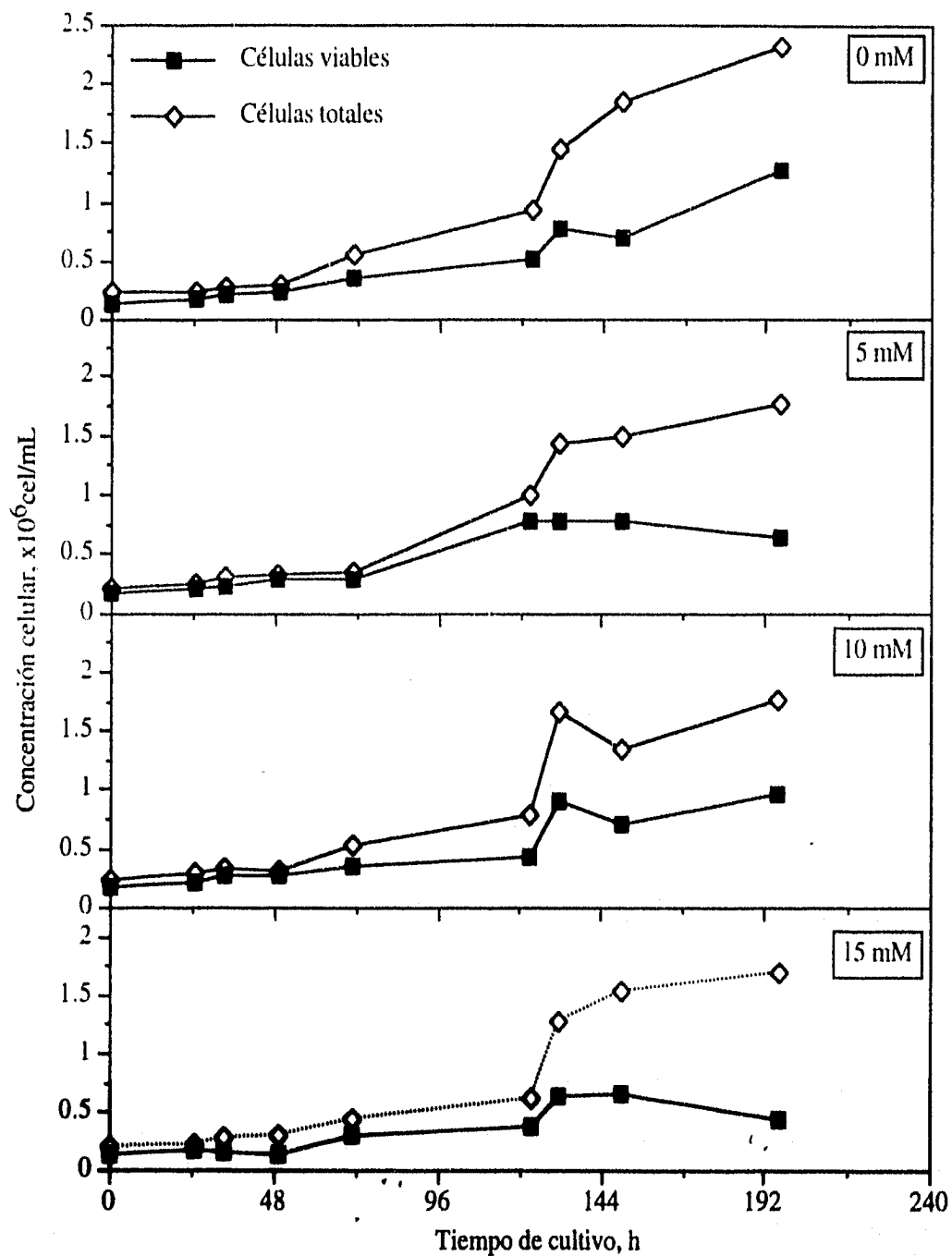


ácido láctico. Para descartar que el efecto tóxico del lactato, si lo hubiera, fuera debido a un cambio de pH, se añadieron estas concentraciones de ácido láctico a medio sin células. Tales concentraciones no provocaron una variación de pH.

Todos los experimentos para determinar el efecto del lactato se realizaron una sola vez. La **Figura 5.10** muestra el efecto del lactato sobre el crecimiento celular, y la **5.11**, el consumo de glucosa y lactato. El consumo específico de glucosa fue mayor en los cultivos a 10 y 15 mM de lactato (ver también **Apéndice II**) El consumo de lactato después del agotamiento de la glucosa sucedió en todas las concentraciones. En el caso de la concentración 15 mM de lactato se observó consumo de lactato desde el inicio del cultivo. En la **Figura 5.12** se muestra la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima alcanzada en los cultivos a diferentes concentraciones de lactato. A 5 mM la concentración celular máxima disminuyó en un 38%, a 10 mM un 43.8% y a 15 mM un 48.2%, comparado con el cultivo control. A pesar de que solo se realizó un experimento a cada concentración de lactato, estas diferencias en las concentración celular son significativas si se utiliza la desviación estándar más grande obtenida en frascos T.  $0.75 \times 10^6$  cel/mL.

El efecto tóxico del lactato se atribuye principalmente a un cambio en el pH del medio de cultivo, o a un cambio de la osmolaridad<sup>51</sup>. En este caso, el efecto del cambio de pH queda descartado, como se había mencionado anteriormente. En ningún cultivo la concentración de lactato fue superior a 15 mM. Queda la posibilidad de un cambio de osmolaridad, aunque es poco probable, debido a las bajas concentraciones añadidas de lactato. No se encontraron reportes sobre el efecto del lactato en el crecimiento de células de insecto. En el caso de células de mamífero, Hassell et al.<sup>25</sup> encontraron que no hay efecto de lactato hasta 20 mM en células McCoy, Vero y BHK, mientras que para hibridomas, el efecto tóxico inició a partir de 10 mM.

En los cultivos lote, la concentraciones de lactato llega hasta 6.6 mM en condiciones de limitación de oxígeno. A partir de el agotamiento de la glucosa se inicia el consumo del lactato, lo que disminuye la posibilidad de que sea tóxico para las células. Aún en cultivos con altas concentraciones celulares ( $7 \times 10^6$  cel/mL), Bédard y colaboradores<sup>4</sup> han reportado que no hay producción de lactato, siempre y cuando el cultivo cuente con oxígeno suficiente. De ahí se concluye que es necesario tener un buen control del oxígeno disuelto en el cultivo para evitar producción de lactato, que podría llegar a niveles tóxicos en cultivos con altas concentraciones celulares. La relación entre la producción de lactato y el OD se estudiará en la **sección 5.6**.



**Figura 5.10** Efecto de la adición inicial de lactato en las cinéticas de crecimiento de cultivos estáticos. En el recuadro se muestra la concentración inicial de lactato.

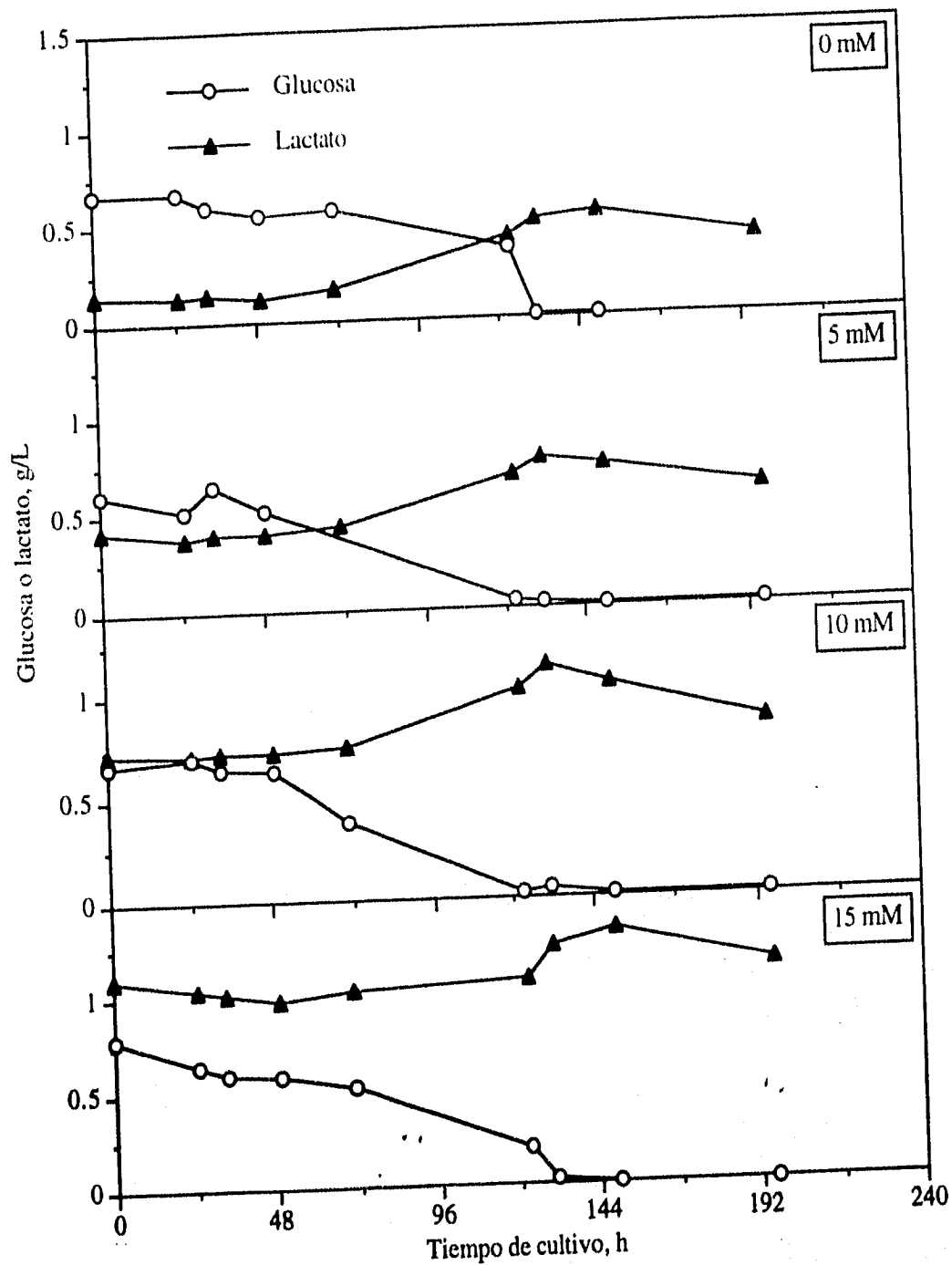


Figura 5.11 Efecto de la adición inicial de lactato en el consumo de glucosa y la producción o consumo de lactato por cultivos estáticos. En el recuadro se muestra la concentración inicial de lactato.

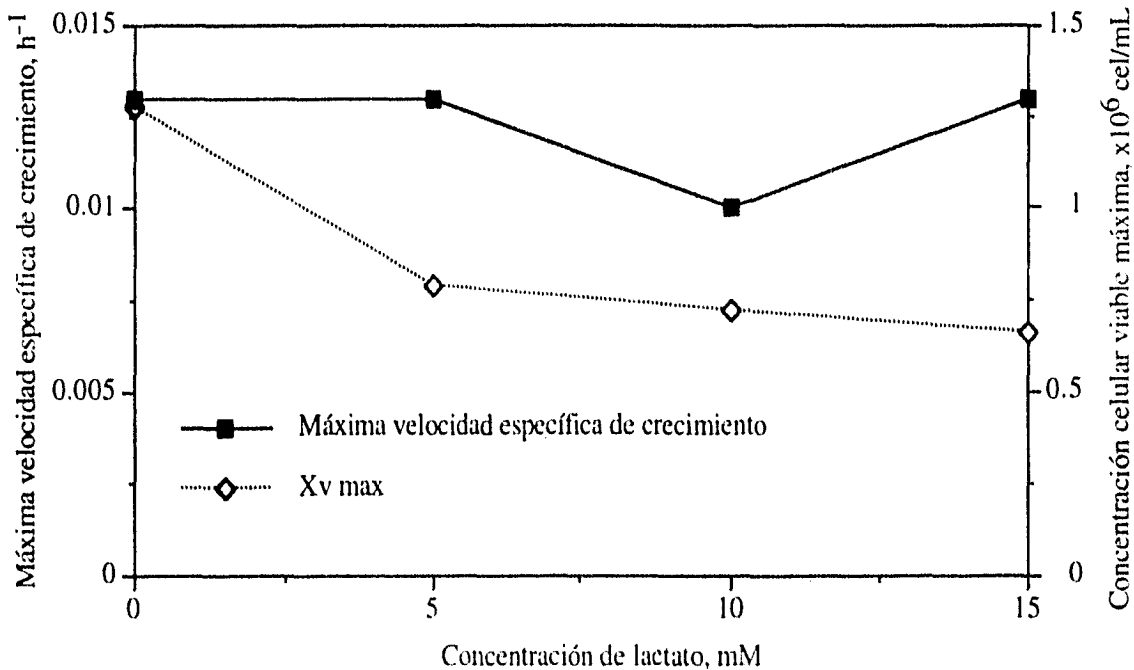


Figura 5.12 Efecto de la adición de lactato en la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular viable máxima

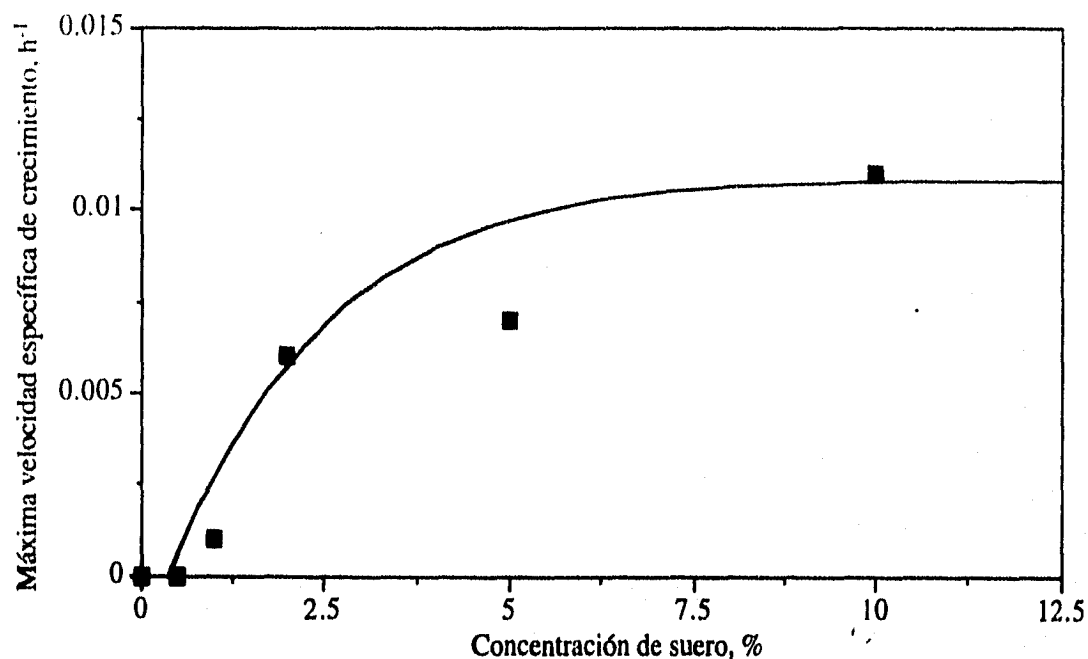
### 5.3.4 Efecto de la concentración de suero fetal bovino

El suero fetal bovino (SFB) es el componente más caro en el medio para el cultivo de células de insecto. Con el fin de conocer los requerimientos de las células de insecto de este compuesto y proveer solo la cantidad necesaria para optimizar el crecimiento celular, se cultivaron las células con diferentes concentraciones de SFB (0, 0.5, 1, 2, 5, 10%). Se realizó un cultivo con cada una de las condiciones. En el **Apéndice II** se muestran las cinéticas de los cultivos a diferentes concentraciones de SFB.

No hubo crecimiento celular en los cultivos con 0 y 0.5% de SFB. En los cultivos por debajo del 10% (5, 2 y 1 %) se observó una disminución de la máxima velocidad específica de crecimiento, comparando con el cultivo a 10% de SFB. En la **Figura 5.13** se observa como la velocidad específica de crecimiento siguió un comportamiento tipo Monod en relación con la concentración de SFB, aunque debido a que no hubo crecimiento con 0 y 0.5% de SFB la curva

no parte del origen. Dalili y Ollis<sup>14</sup> observaron un comportamiento similar en cultivos de hibridomas, aunque la menor concentración de suero que probaron fue la de 2%.

Hay un efecto importante en la concentración celular máxima alcanzada, ya que entre 5 y 10% de SFB se obtiene casi el doble de la concentración celular (Figura 5.14). Estos resultados confirman la necesidad de añadir 10% de SFB al medio TNM-FH para lograr el crecimiento adecuado de Sf-9. No existen en la literatura trabajos sobre el efecto de la concentración celular de SFB en cultivos de Sf-9. El único reporte sobre SFB y su efecto en el crecimiento de células de insecto es el de Léry y Fediere<sup>34</sup>, que observaron un crecimiento celular muy lento de células del insecto *Christoneura fumiferana* con 5% de suero fetal bovino en medio Grace y muerte celular a 2% de SFB. Sin embargo, no reportan valores cuantitativos sobre la disminución de la concentración celular.



**Figura 5.13** Efecto de la concentración de suero fetal bovino en la máxima velocidad específica de crecimiento. La línea solo indica la tendencia de los datos.

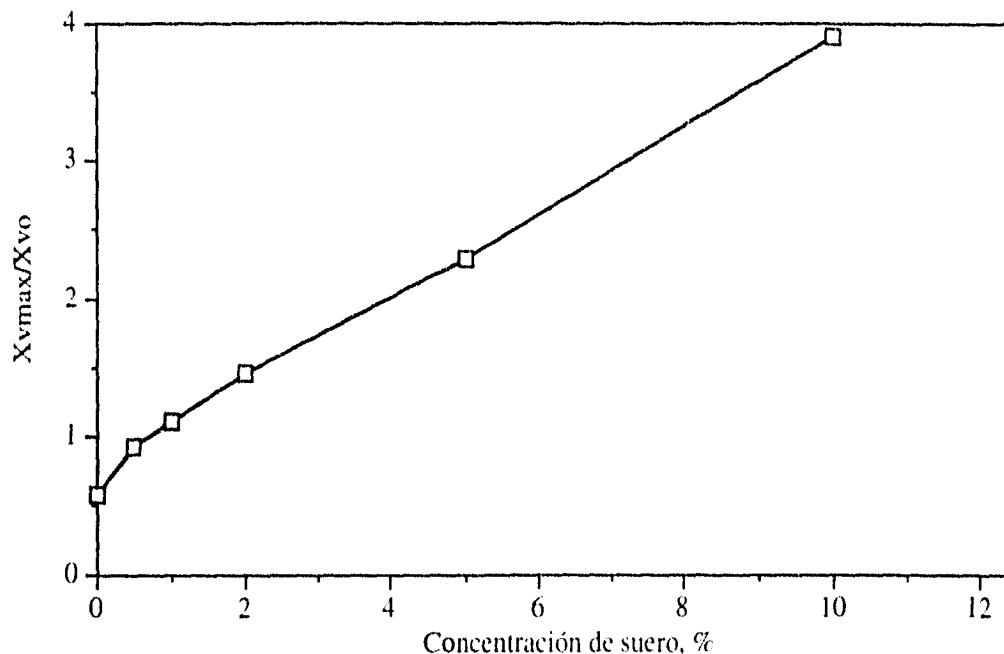
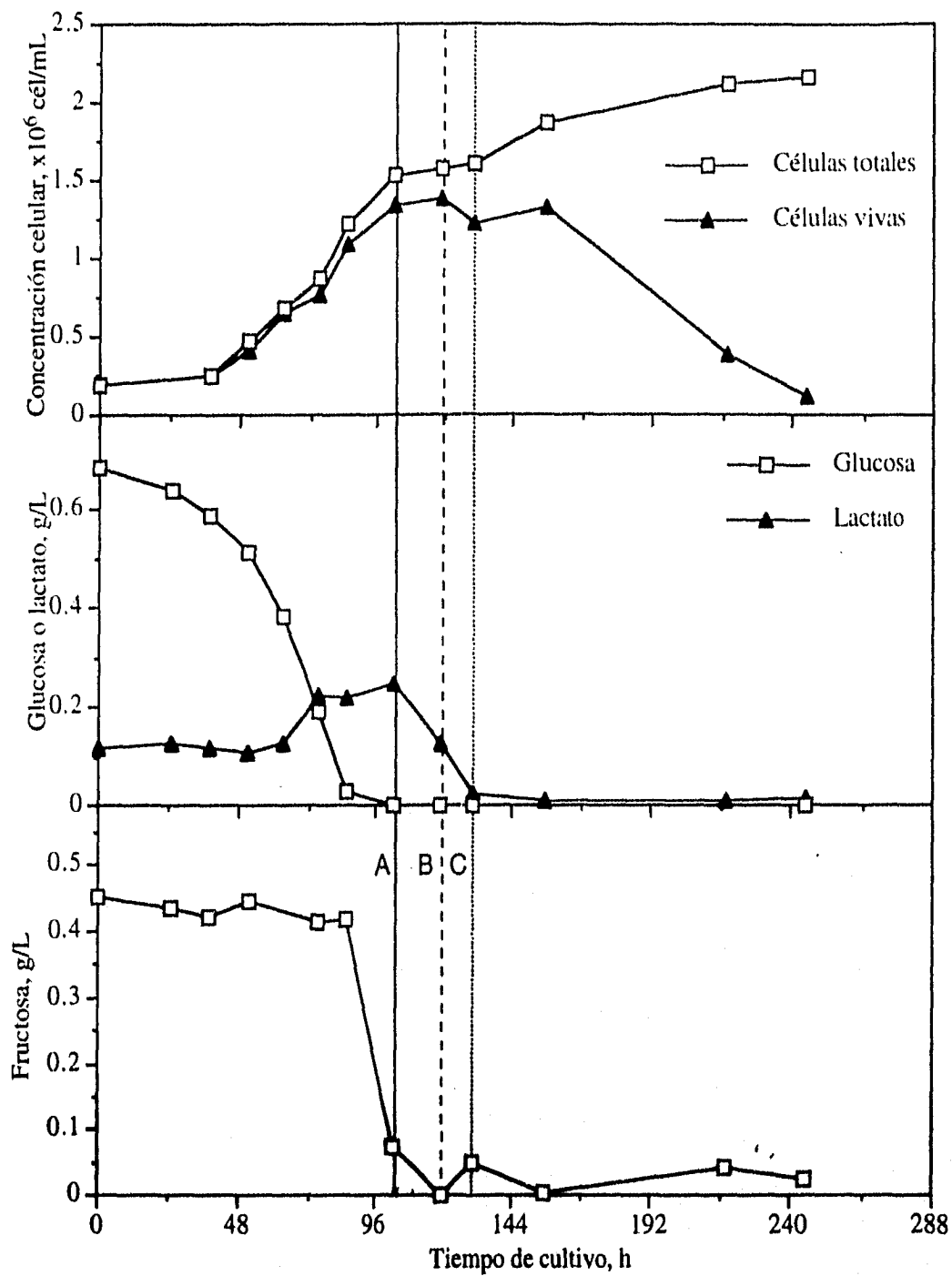


Figura 5.14 Efecto de la concentración de suero fetal bovino en la concentración celular viable máxima

## 5.4 Cultivo en suspensión

### 5.4.1 Caracterización del crecimiento en frascos agitados

El cultivo en suspensión de las células de insecto tiene varias ventajas, como la factibilidad de escalamiento, una mejor transferencia de masa, y el mantener las células en suspensión (no es necesario despegar las células de la pared de los frascos), lo que resulta en cultivos homogéneos. La mejor transferencia de oxígeno trae como consecuencia una menor generación de lactato. Como se puede observar en la **Figura 5.15**, se producen solo 0.25 g/L de lactato, mientras que en cultivo estático se producen hasta 0.6 g/L (ver **Figura 5.3**). La glucosa es la principal fuente de carbono. A partir de que la concentración de glucosa es menor que 0.2 g/L inicia el consumo de fructosa. La fructosa se consume hasta su agotamiento. El lactato también se consume a partir de que la glucosa y fructosa alcanzan niveles menores de 0.1 g/L. En el **Apéndice III** se muestran cinéticas de otros cultivos en frascos agitados, y los correspondientes parámetros cinéticos y estequiométricos relevantes.



**Figura 5.15** Cinéticas típicas de crecimiento y consumo de nutrientes en cultivo en suspensión en frascos agitados. Las líneas marcan el agotamiento de las fuentes de carbono: A) glucosa, B) fructosa, C) lactato.

En la **Tabla 5.3** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular viable máxima antes del agotamiento de la glucosa, periodo en el que el cultivo permaneció en la fase de crecimiento exponencial. Se muestra la media y desviación estándar de tres cultivos. Los resultados fueron muy similares para los tres cultivos, con una desviación máxima del 12%. La máxima velocidad específica de crecimiento en frascos agitados fue mayor que en cultivos estáticos ( $0.025 \text{ h}^{-1}$  y  $0.014 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente). La máxima velocidad específica de crecimiento en frascos agitados resultó ser igual a la reportada por Kioukia et al.<sup>32</sup> en las mismas condiciones; y menor a la reportada por Drews et al.<sup>16</sup>,  $0.03 \text{ h}^{-1}$ . La concentración celular viable máxima alcanzada antes del agotamiento de glucosa fue 50% mayor en el cultivo en suspensión que en el cultivo estático. Sin embargo, al final de el cultivo la concentración celular viable máxima es igual para ambos sistemas. Esto es debido a que en el cultivo estático la glucosa se desvió hacia lactato, que fue consumido después del agotamiento de glucosa, para generar biomasa (ver también **Tabla 5.2**). Ya que la producción de lactato fue baja, cuando se agotó la glucosa las células entraron a fase estacionaria. La concentración celular máxima alcanzada en estos cultivos ( $2.15 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ ) fue similar a la reportada por Kioukia et al.<sup>32</sup>, que obtuvieron concentraciones celulares máximas de entre  $1.9$  y  $2.37 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ ; y Drews et al.<sup>16</sup> que reportaron concentraciones de  $1$  a  $3 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ . En cuanto al rendimiento de glucosa, Drews et al.<sup>16</sup> reportaron un rendimiento de  $5.38 \times 10^6 \text{ cel/g}$ , muy inferior al obtenido en este trabajo,  $1389 \times 10^6 \text{ cel/g}$ . Sin embargo, el rendimiento reportado por Drews et al.<sup>16</sup> no es creíble, ya que multiplicando el rendimiento obtenido por ellos por la concentración de glucosa en un litro de medio,  $0.7\text{g}$ , se obtendría una concentración celular de  $3.7 \times 10^3 \text{ cel/mL}$ , mientras que en su trabajo reportan la obtención de  $1$  a  $3 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ . Nguyen et al.<sup>48</sup> obtuvieron un coeficiente metabólico de glucosa de  $0.021 \text{ mg}/\times 10^6 \text{ cel h}$ , similar al obtenido en este trabajo, que fue de  $0.018 \text{ mg glucosa}/\times 10^6 \text{ cel h}$ . En el **Apéndice III** se muestran los resultados de experimentos realizados para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de glucosa y la posibilidad de la sustitución de glucosa por lactato.

En la **Figura 5.16** se reporta la cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivos en frascos agitados. Debido a la disponibilidad del equipo, solo se analizó la concentración de los aminoácidos en uno de los cultivos. No se observó la clara división en la cinética relacionada con la fuente de carbono observada en cultivos estáticos (ver **Figura 5.4**). Al principio, todos los aminoácidos se consumieron. La alanina y el ácido glutámico se consumen ligeramente y después se produjeron a lo largo de todo el cultivo. Posteriormente, las concentraciones de otros aminoácidos permanecen relativamente constantes, excepto la de cistina y glutamina, que se consumen a lo largo de todo el cultivo. Después del agotamiento de la



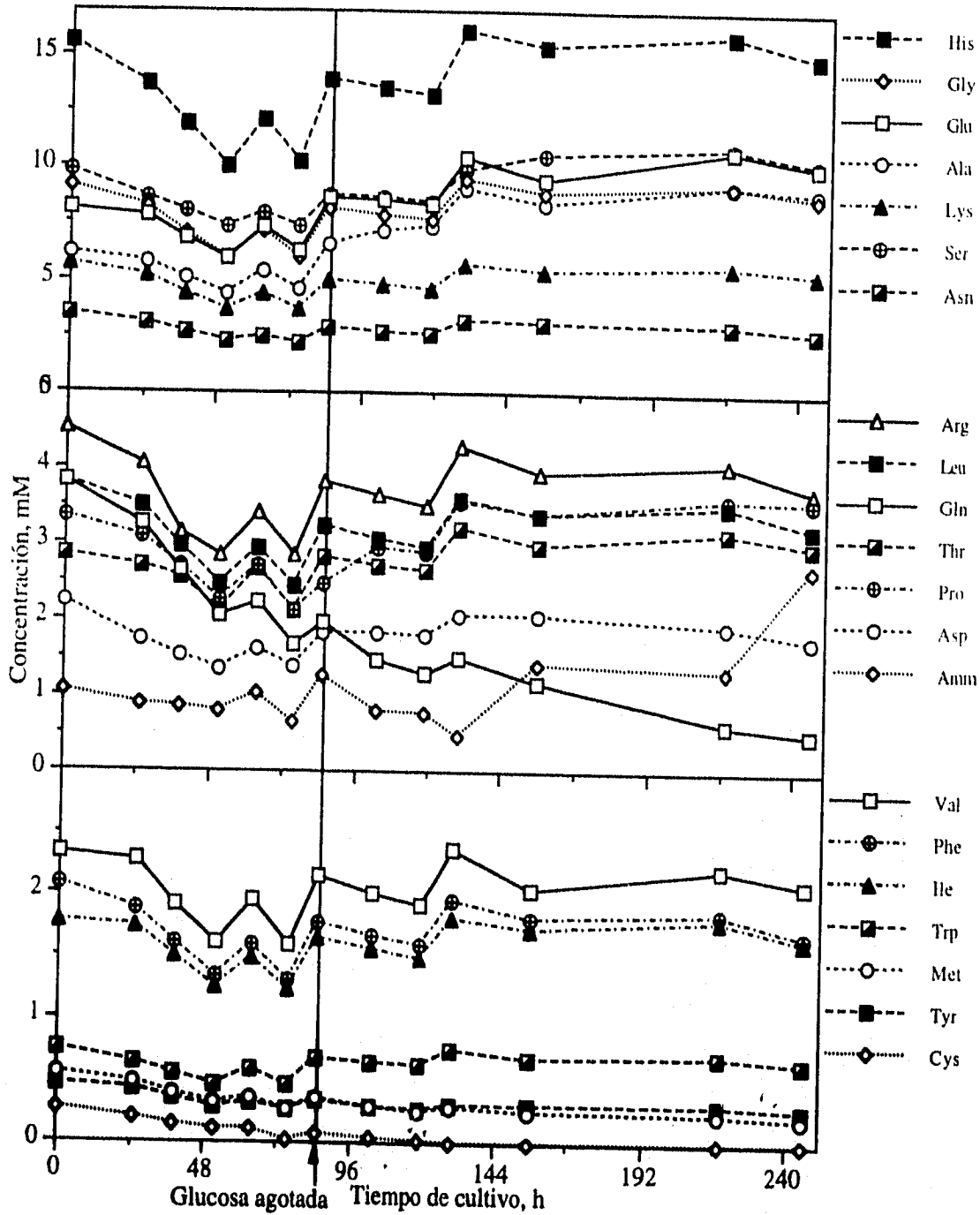
glucosa se producen alanina, glicina, serina, lisina, histidina, treonina y ácido glutámico. La concentración de amonio se incrementó ligeramente hasta las 130 horas de cultivo. A partir de las 130 horas, el amonio se produjo de manera importante. Este cambio coincidió con la entrada del cultivo a la fase de muerte.

**Tabla 5.3** Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular máxima en cultivos en suspensión. Media y desviación estándar de tres cultivos.

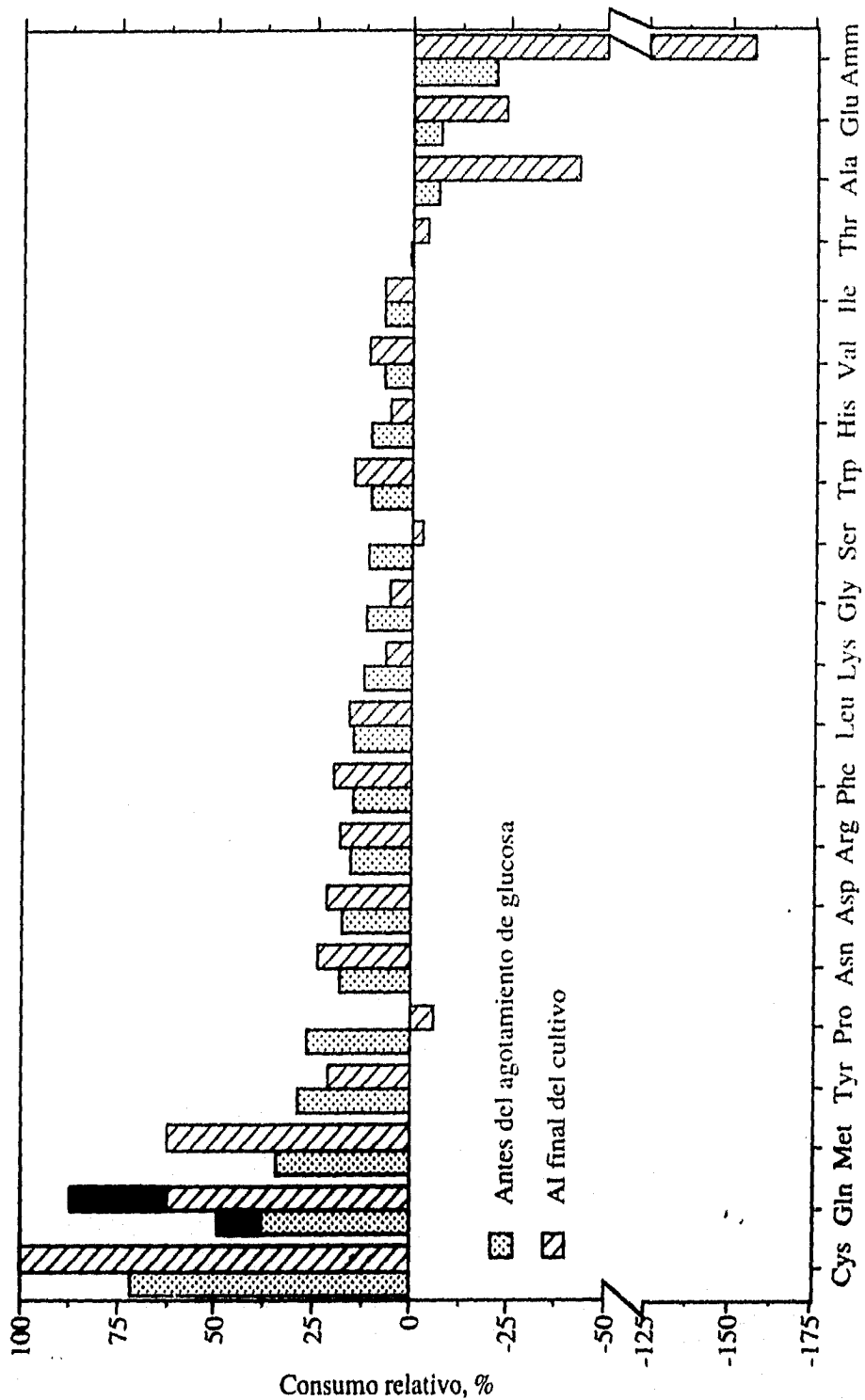
Máxima velocidad específica de crecimiento, $h^{-1}$	Al agotamiento de glucosa	0.025 +/- 0.001
Xv máxima $\times 10^6$ cel/mL	Al agotamiento de glucosa	1.069 +/- 0.138
	Al final del cultivo	1.245 +/- 0.120
Xr máxima $\times 10^6$ cel/mL	Al agotamiento de glucosa	1.273 +/- 0.113
	Al final del cultivo	2.152 +/- 0.053

Xv significa concentración celular viable. Xr significa concentración celular total

La **Figura 5.17** muestra el consumo relativo de los aminoácidos antes del agotamiento de glucosa y al final del cultivo. En el caso de la glutamina, la altura total de la columna corresponde a su desaparición, la sección de la columna en negro corresponde a la degradación espontánea, y el resto de la columna corresponde al consumo real. A lo largo del cultivo, el aminoácido de mayor consumo fue la cistina, la cual se consumió en un 72% al agotamiento de glucosa, y en un 100% al final del cultivo. La cistina fue el único aminoácido que se agotó. El segundo aminoácido de mayor consumo fue la glutamina que se consumió en un 38% antes del agotamiento de glucosa y en un 62.4% al final del cultivo. La metionina se consumió casi en la misma cantidad que la glutamina, con un consumo del 34.5% al agotamiento de glucosa, y en un 62.4% al final del cultivo. El resto de los aminoácidos se mantuvieron en concentraciones relativamente altas, por lo que no limitan el crecimiento celular. Esto concuerda con lo reportado por Drews et al.<sup>16</sup>, quienes observaron que ninguno de los aminoácidos se agotaron a lo largo del cultivo. Sin embargo, en su trabajo no determinaron cistina. Tanto las observaciones de Drews et al.<sup>16</sup>, Bédard et al.<sup>5</sup> y este trabajo coinciden con que la glutamina no limita el crecimiento celular en cultivos lote de Sf-9 en medio TNM-FH. En la literatura<sup>41</sup>, se reportan valores del coeficiente metabólico de glutamina en cultivos en frascos agitados de  $71.53 \mu\text{mol}/\times 10^9 \text{ cel h}$  a  $9.3 \mu\text{mol}/\times 10^9 \text{ cel h}$ . El valor obtenido en este trabajo,  $40 \mu\text{mol}/\times 10^9 \text{ cel h}$ , se encuentra dentro de este rango.



**Figura 5.16** Cinética de consumo o producción de aminoácidos en cultivo en suspensión en frascos agitados. La línea señala el momento de agotamiento de la glucosa, que corresponde a las 84 horas de cultivo.

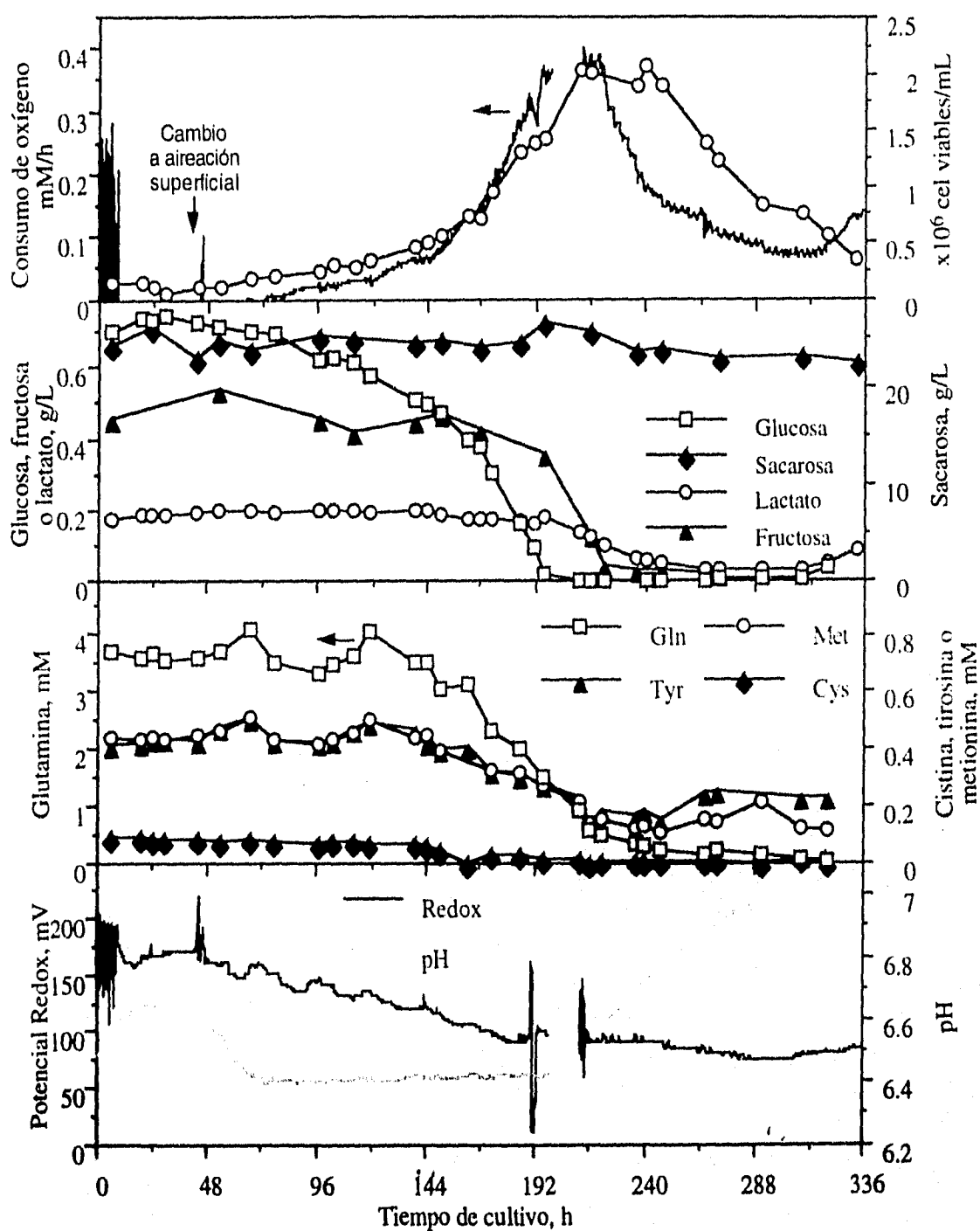


**Figura 5.17** Consumo relativo de aminoácidos en cultivo en suspensión en frascos agitados. Las barras negras indican la descomposición espontánea de la glutamina. Solo se consideró la descomposición espontánea de glutamina, ya que el resto de los aminoácidos se degradaron espontáneamente en menos de un 5%.

### 5.4.2 Cultivos en biorreactor

El cultivo de células de insecto en biorreactores instrumentados permite un estricto control de las distintas variables ambientales, como temperatura y OD; y un monitoreo completo de aquellas variables que no se controlan, como pH y redox. En los primeros experimentos en biorreactor, la transferencia de masa no fue suficiente para controlar el OD. Para mejorar la transferencia de masa en el reactor, se utilizó, además de la barra magnética suspendida, un segundo impulsor de cuatro paletas modificado como se explica en Materiales y Métodos. Con el fin de evitar subsecuentes problemas de transferencia de masa, se procedió a efectuar un cultivo con aireación sumergida como lo reportan Murhammer y Goochee<sup>46</sup>. Debido a los esfuerzos de corte a los que se sometieron las células no hubo crecimiento celular y disminuyó la viabilidad del 82 al 30%. A las 42 h se pasó a aireación superficial y se cambió el flujo de gases de 0.43 vvm a 0.5 L/min. El oxígeno disuelto (OD) se mantuvo constante en 30% a lo largo del cultivo.

Como se puede observar en la **Figura 5.18**, después de un periodo de adaptación, el crecimiento celular procedió de forma normal. El crecimiento celular siguió un comportamiento similar al de los frascos agitados. El agotamiento de glucosa marcó el inicio de la fase estacionaria de crecimiento. El consumo de oxígeno sigue el mismo perfil que la curva de crecimiento celular, es decir, incrementa exponencialmente conforme aumenta la concentración celular. En el momento en el que se agotó la glucosa, el consumo de oxígeno permaneció constante y las células entraron a la fase estacionaria de crecimiento. El consumo de oxígeno cayó cuando se agotó la fructosa. Este comportamiento contrasta con el reportado por Higareda<sup>27</sup>, quien observó una drástica caída en el consumo de oxígeno de hibridomas en el momento en el que se agotó la glucosa. Sin embargo, se debe considerar que en el medio de cultivo utilizado por Higareda<sup>27</sup> solo hay una fuente de carbono metabolizable, la glucosa, mientras que en el TNM-FH hay glucosa, fructosa y lactato. Las células permanecieron en fase estacionaria hasta el agotamiento de lactato. La fase de muerte inicia aproximadamente 24 horas después de la caída en el consumo de oxígeno. En otro cultivo en lote (**Figura 5.19**) en el que hubo problemas para controlar el OD, hubo una producción de lactato de hasta 0.6 g/L. En este caso se observa como el agotamiento de lactato también provoca una disminución en el consumo de oxígeno. Esto indica que el agotamiento de esta fuente de carbono, también puede provocar el cese en la respiración. En lo subsecuente, toda la discusión de esta sección se referirá solo al cultivo mostrado en la **Figura 5.18**.



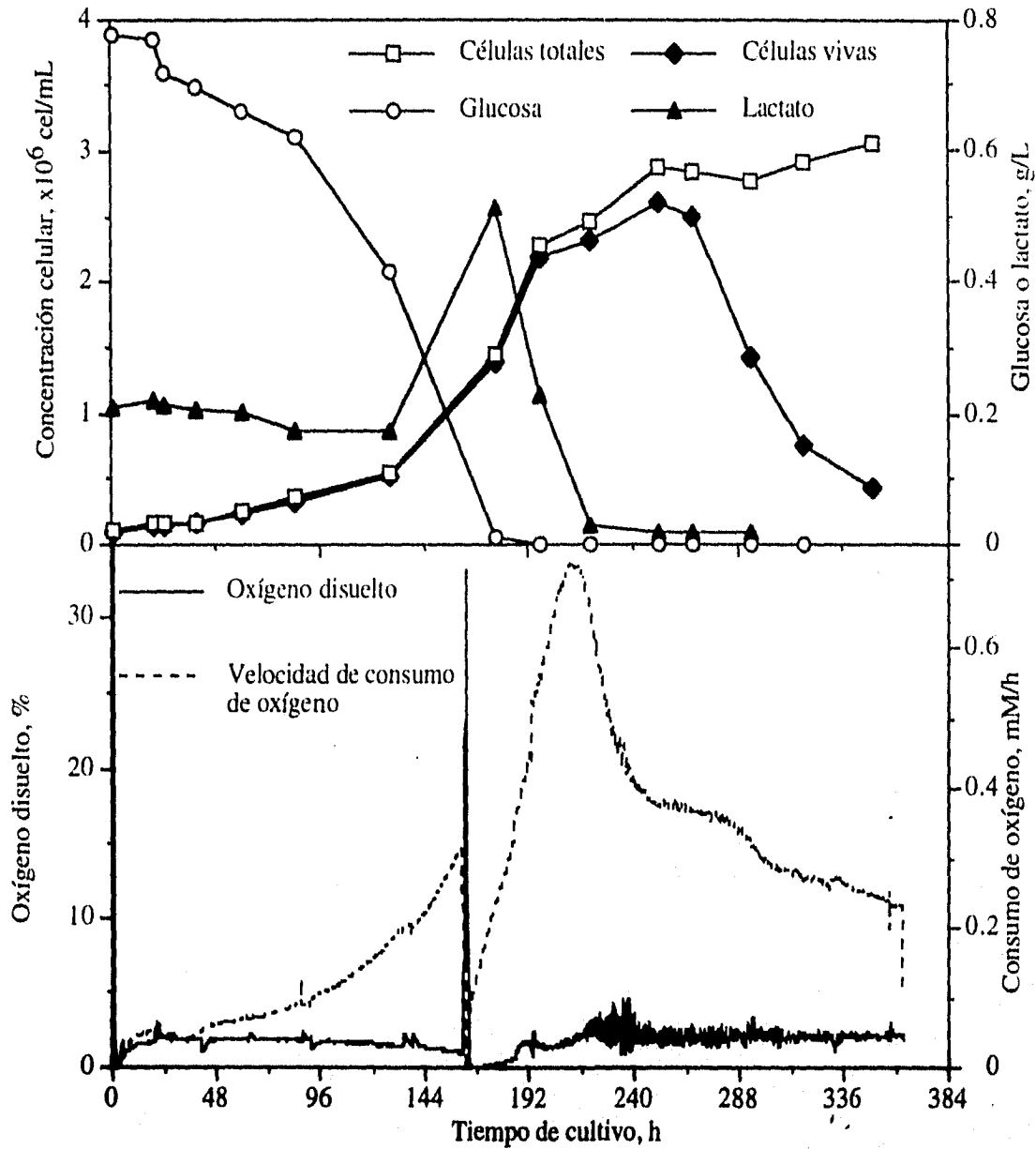
**Figura 5.18** Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrimentos en biorreactor. Debido a fallas en el sistema, no se adquirieron datos de las 205 a las 217 horas. El oxígeno disuelto fue controlado al 30%.

El perfil del consumo de oxígeno en estos cultivos y su relación con los cambios en el estado del cultivo puede ser utilizado como una valiosa herramienta para diseñar estrategias computarizadas de alimentación de nutrimentos y permitirá inferir el estado del cultivo. Utilizando esta herramienta, es posible alimentar los nutrimentos justamente en el momento en que el cultivo los requiere, lo que disminuye la generación de metabolitos tóxicos y reduce los costos de producción, pues se alimenta únicamente el nutrimento que se ha agotado. Como se discutirá más adelante, el consumo de oxígeno obtenido en línea permite conocer inmediatamente la concentración celular y la fase de crecimiento en la que se encuentra en cultivo, con lo que es posible tomar decisiones a partir de información obtenida en línea, sin los retrasos inherentes de los métodos de análisis de muestras fuera de línea y sin perturbar el sistema. El consumo de oxígeno permite, además, detectar contaminaciones, pues un microorganismo extraño en el cultivo resultará en un consumo de oxígeno mayor, fácilmente detectable.

No hubo producción de lactato en el cultivo, aunque el lactato presente en el suero fetal bovino se consumió cuando los niveles de glucosa fueron próximos a cero. En la fase de consumo de lactato hubo un aumento de las células viables, a diferencia del caso del frasco agitado, en donde aumentó ligeramente la concentración total de células pero las células viables disminuyeron. Esto puede deberse a una limitación por oxígeno en los cultivos en los frascos agitados. La fructosa se consumió a partir de que la concentración de glucosa se encontraba por debajo de los 0.2 g/L. Existe poca información en la literatura sobre el consumo de la fructosa, ya que generalmente no se determina, a pesar de estar presente en el medio de cultivo. No hubo consumo de sacarosa en el cultivo, aún cuando el resto de los carbohidratos se habían consumido en su totalidad.

Los aminoácidos glutamina, metionina, tirosina y cistina se consumieron a lo largo de todo el cultivo. La cistina se agotó a las 160 horas de cultivo. La glutamina es el segundo aminoácido de mayor consumo, aunque no se consume totalmente. La metionina y tirosina, aminoácidos esenciales para las células de insecto, continuaron presentes en el medio al final del cultivo. Las cinéticas completas de consumo/producción de los aminoácidos se encuentran en el **Apéndice IV**.

El pH disminuyó al inicio de la fase de crecimiento exponencial; permaneció constante a lo largo de la fase de crecimiento exponencial y aumentó conforme las células entraron a la fase de crecimiento estacionaria, con el respectivo cese en la respiración. A pesar de que no hubo control de pH a lo largo del cultivo, éste permaneció en valores no inhibitorios para el crecimiento



**Figura 5.19** El agotamiento de lactato también provoca una disminución en el consumo de oxígeno. El aumento en el OD provocó la acción de control de cerrar el flujo de oxígeno. El cultivo permaneció por debajo del OD deseado, 2%, lo que provocó la producción de lactato. El bajo OD provocó una disminución en el consumo de oxígeno a las 170 h, como se verá en la sección 5.6. Cuando se restableció el control del OD, el consumo de oxígeno recuperó los valores de antes de la perturbación.

celular<sup>33</sup> hasta el final del cultivo, cuando en la fase de muerte tardía el pH aumentó solamente hasta 7.05. El potencial redox disminuyó a lo largo de la fase de crecimiento exponencial y permaneció relativamente constante en la fase estacionaria y la fase de muerte celular. No respondió especialmente a algún evento, excepto a los cambios de OD. En todos los cultivos se obtuvo un comportamiento similar de pH y redox, por lo que no se muestran en este trabajo.

En la **Tabla 5.4** se muestran los parámetros cinéticos y estequiométricos para este cultivo. La máxima velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial durante la aireación superficial fue de  $0.026 \text{ h}^{-1}$ , muy similar a la que se obtiene en frascos agitados ( $0.024 \text{ h}^{-1}$ ). La concentración celular viable máxima de  $2.06 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ , fue un 35% mayor que en cultivo en frascos agitados ( $1.34 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ ). Paralelamente, la concentración celular máxima ( $3.07 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ ) resultó 30% mayor que en el cultivo en frascos agitados ( $2.15 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ ). Además, la viabilidad a lo largo del cultivo en biorreactor se mantuvo entre un 95-99 %, después de que se recuperó el cultivo del daño por la aireación sumergida; mientras que la viabilidad en cultivos en frascos agitados se mantiene entre 90 y 95%.

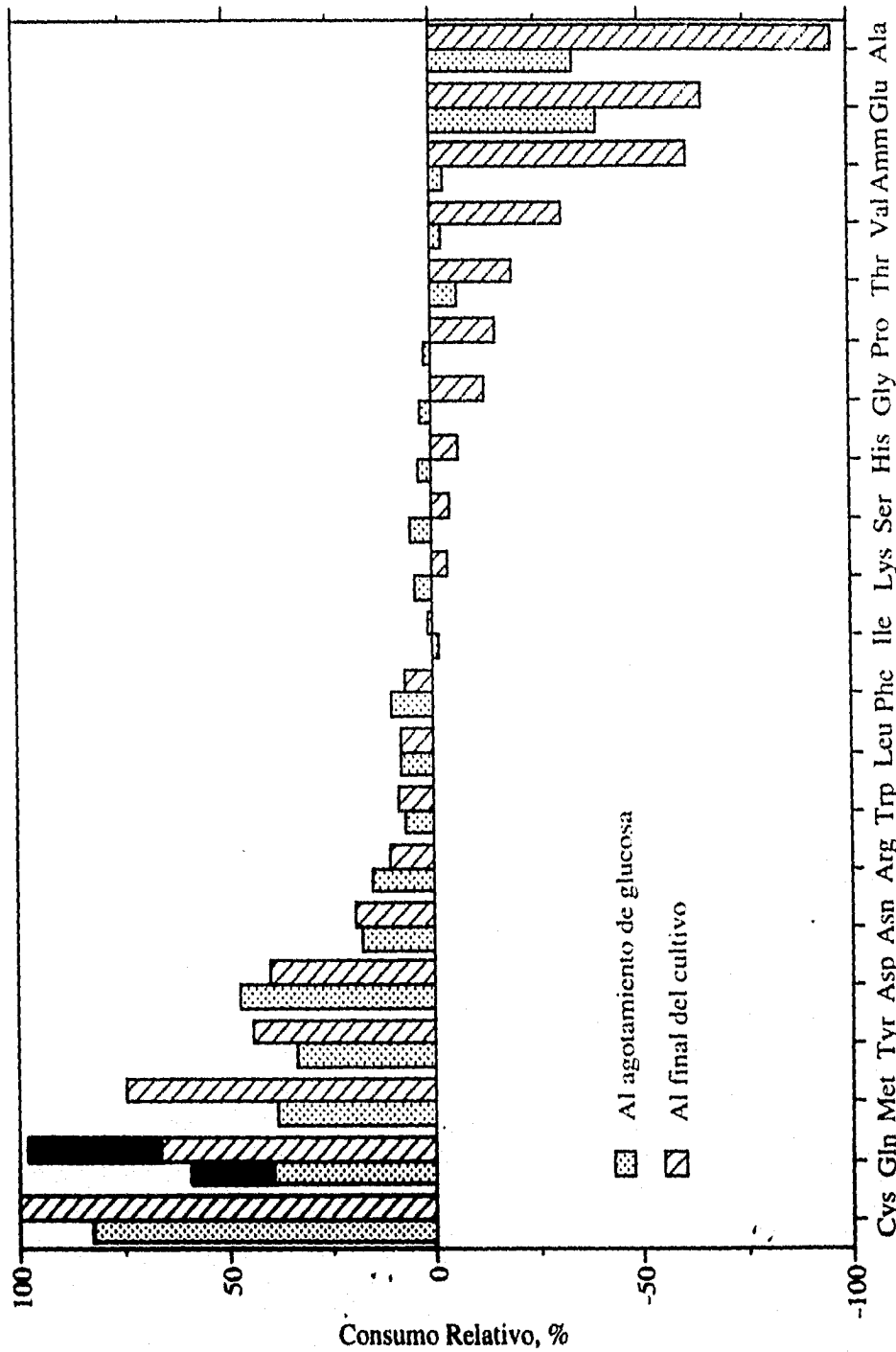
**Tabla 5.4** Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular máxima en cultivo en biorreactor

Velocidad de crecimiento, $\text{h}^{-1}$	0.024
$X_v$ máxima, $\times 10^6 \text{ cel/mL}$	2.062
$X_T$ máxima, $\times 10^6 \text{ cel/mL}$	3.066

$X_v$  significa concentración celular viable.  $X_T$  significa concentración celular total

El consumo relativo de los aminoácidos al agotamiento de glucosa y al final del cultivo, se muestran en la **Figura 5.20**. La cistina fue el aminoácido de mayor consumo, con un consumo relativo del 82% al agotamiento de glucosa y de 100% al final del cultivo. Esto coincide con lo reportado por Ferrance et al.<sup>19</sup> para cultivos de Sf-9 en biorreactor en medio IPL-41, que contiene el doble de cistina que el TNM-FH, pero sostiene concentraciones celulares del doble que el TNM-FH<sup>16</sup>. La metionina se consumió en 75 % al final del cultivo. Kamen et al.<sup>31</sup> reportaron un consumo de metionina del 100% al final de un cultivo en el que alcanzaron una concentración celular de  $5.4 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ . La glutamina fue el tercer aminoácido de mayor consumo, aunque, debido a la degradación espontánea, su concentración disminuyó en un 99% hacia el final del cultivo. Al agotamiento de glucosa, la concentración de glutamina había





**Figura 5.20 Consumo relativo de aminoácidos en fermentación en lote a 30% OD.** Valores negativos se refieren a producción. Solo se consideró la degradación espontánea de glutamina, ya que el resto de los aminoácidos se degradan espontáneamente en menos de un 5%. La altura total de la columna corresponde a desaparición, la sección de la columna en negro corresponde a la degradación espontánea, y el resto de la columna corresponde al consumo real.

disminuido en un 59 %, por lo que aún estaba presente en el medio de cultivo cuando las células entraron a fase estacionaria. Tirosina, ácido aspártico, asparagina, arginina, triptofano, leucina y fenilalanina fueron consumidos durante todo el cultivo, aunque no disminuyeron su concentración inicial en más del 50%. La isoleucina mantuvo su concentración prácticamente constante a lo largo de todo el cultivo. La lisina, serina, histidina, glicina y prolina fueron ligeramente consumidas antes del agotamiento de glucosa, y se produjeron al final del cultivo. La alanina fue el aminoácido de mayor producción en el cultivo, con una concentración final de 190% con respecto al inicio del cultivo. Bédard et al.<sup>5</sup> y Kamen et al.<sup>31</sup> han reportado producción de alanina durante la fase de crecimiento en cultivos de células de insecto. La concentración de ácido glutámico aumentó en un 40% al agotamiento de glucosa y en un 70% al final del cultivo. La valina y la treonina también fueron producidas por las células antes y después del agotamiento de glucosa. La concentración de amonio se mantuvo en o por debajo de 3.5 mM, concentración que no afecta el crecimiento celular<sup>5</sup>.

Este cultivo permitió conocer el comportamiento de las células de insecto en biorreactor. Sin embargo, la aireación sumergida provocó la muerte de una gran cantidad de células y condiciones diferentes a las de otros cultivos, lo que debe tomarse en cuenta al hacer comparaciones.

### **5.5 Comparación entre los diferentes sistemas de cultivo de células de insecto.**

Las diferentes técnicas de cultivo, como ya se ha discutido, tienen varias ventajas y desventajas. En la **Tabla 5.5** se resumen los resultados obtenidos en los cultivos en frasco T, frasco agitado y biorreactor instrumentado. En cultivo en frasco T, se obtiene una concentración celular menor en mayor tiempo, ya que la velocidad de crecimiento es mayor. El mayor inconveniente de los frascos T es la baja viabilidad de los cultivos. Un cultivo en estas condiciones se mantiene con una viabilidad menor al 85 %. Para obtener una óptima expresión de proteínas es necesario tener un cultivo con una viabilidad superior al 90%. Sin embargo, para realizar estos cultivos solo se requiere de mínimo equipo.

Los cultivos en frascos agitados se mantienen con viabilidades mayores al 90 %. La concentración celular alcanzada es mayor que en los frascos T, con viabilidades también mayores. Sin embargo, en estos cultivos no instrumentados no es posible mantener un control

estricto de las condiciones de cultivo, como OD. La falta de control de la tensión de oxígeno disuelto en estos cultivos es más grave cuando se trabaja en la fase de producción de proteínas, ya que se ha reportado un aumento en el requerimiento de oxígeno en esta fase<sup>72, 61</sup>. Además, es imposible utilizar estrategias de control como las descritas anteriormente. Este tipo de cultivos se utiliza cuando se desea producir proteínas o virus a baja escala.

En los cultivos en biorreactor instrumentado la concentración celular máxima alcanzada es mayor. Además, se puede monitorear constantemente el estado del cultivo. Este monitoreo proporciona información que permite el diseño de estrategias de control con las que se pueden obtener mayores rendimientos de células, proteína recombinante o virus. El control del oxígeno disuelto por arriba de las concentraciones críticas es de gran importancia, como se discutirá en la siguiente sección. La desventaja de esta técnica de cultivo es que requiere de una mayor cantidad de equipo con un mayor costo. Sin embargo, cuando se desea producir a una escala mayor, este costo adicional se justifica, ya que es la única opción de escalamiento en sentido estricto.

**Tabla 5.5 Comparación entre cultivos realizados en frasco T, frasco agitado y biorreactor instrumentado**

Parámetro	Frasco T	Frasco agitado	Biorreactor*
Máxima velocidad específica de crecimiento, h <sup>-1</sup>	0.014 +/- 0.0006	0.025 +/- 0.001	0.024
Concentración celular viable máxima, x 10 <sup>6</sup> cel/mL	1.14 +/- 0.135	1.445 +/- 0.120	2.062
Concentración celular máxima x 10 <sup>6</sup> cel/mL	2.156 +/- 0.150	2.352 +/- 0.053	3.066

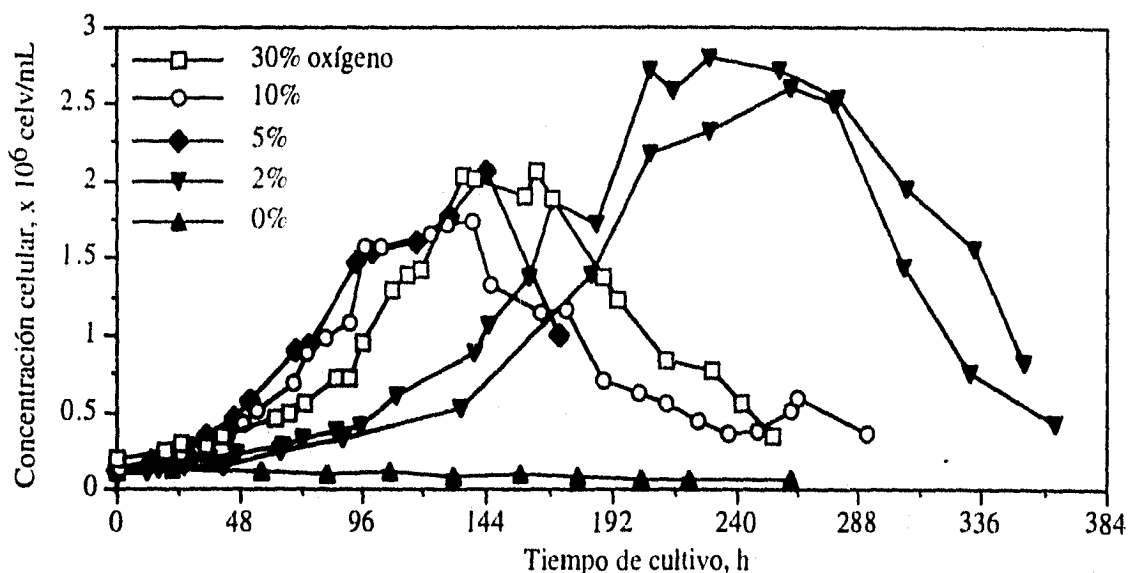
\* Cultivo burbujeado

## 5.6 Efecto del OD en el crecimiento celular

El oxígeno es un nutrimento indispensable para el crecimiento celular. El conocer el intervalo de tensión de oxígeno ideal para el crecimiento celular permitirá conocer el margen de operación de biorreactores, especialmente aquellos con deficiencias en el mezclado.

Se cultivaron las células en tensiones de oxígeno de 0, 2, 5, 10 y 30% con respecto a la saturación del aire. El cultivo a 2% se hizo por duplicado. Ya que las cinéticas de crecimiento y

el consumo de nutrientes fueron similares, solo se muestran las gráficas para uno de los cultivos y solo se analizaron aminoácidos para uno de los cultivos. A pesar de que no se realizaron duplicados de los cultivos a 10 y 30% OD, los cultivos alimentados a estos OD (sección 5.7) pueden ser considerados como duplicados si se toman los datos antes de realizar la primera alimentación. Estos cultivos se utilizaron para el cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos a las diferentes tensiones de oxígeno. En la **Figura 5.21** se muestran las cinéticas de los cultivos a diferentes OD. Las cinéticas de los cultivos por arriba del 2% tienen comportamientos bastante similares, mientras que los cultivos a 2% duran 7 días más que el resto de los cultivos, debido a que en estos cultivos la máxima velocidad específica de crecimiento es menor. A 0% de OD no hubo crecimiento, sino muerte celular.



**Figura 5.21** Efecto del OD sobre el crecimiento de células de insecto

En la **Figura 5.22** se muestra el consumo o producción de carbohidratos y lactato en los cultivos a diferentes OD. Los resultados que no se muestran no se determinaron por falta de reactivos. El consumo de glucosa depende de la velocidad de crecimiento, ya que los cultivos con velocidades de crecimiento mayores la consumen más rápidamente. A pesar de que en el cultivo a 0% de OD no hubo crecimiento celular, hubo consumo de glucosa. Esta glucosa fue convertida por las células en lactato. Por cada mol de glucosa consumida se generaron 2.2 moles de lactato. Esto indica que otra fuente de carbono, posiblemente fructosa (no determinada), fue transformada también en lactato por las células. A otros OD, solo se consumió lactato cuando la

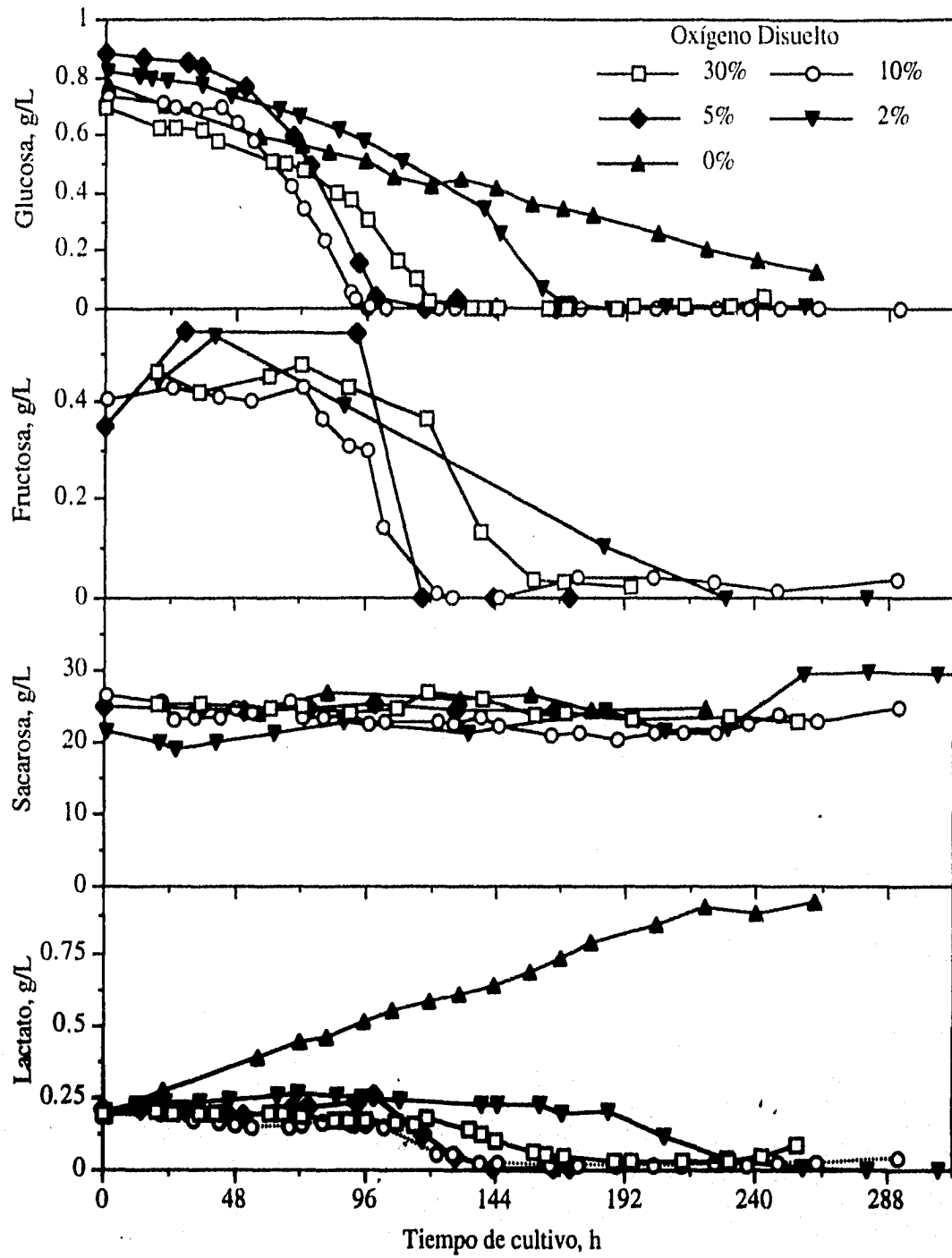


Figura 5.22 Efecto del OD en el consumo/producción de carbohidratos y lactato.

concentración de glucosa fue menor de 0.2 g/L. La concentración de sacarosa fue relativamente constante a lo largo de los cultivos. En los cultivos a OD menor de 10% hubo una ligera producción de lactato, que se consumió después del agotamiento de glucosa. Reuveny et al.<sup>58</sup> reportan producción de lactato en un cultivo con OD controlado a 15 %, mientras que en este trabajo solo se detectó producción de lactato a OD por debajo del 5%. Sin embargo, el cultivo de Reuveny et al. se realizó en reactor de 5L a 80 rpm, por lo que se puede tratar de un cultivo no homogéneo, en el que algunas células se encontraban en regiones con tensiones de oxígeno bajas, lo que probablemente originó la producción de lactato.

Las cinéticas de consumo o producción de los principales aminoácidos a diferentes OD se muestran en la **Figura 5.23**. La glutamina se consumió o degradó espontáneamente (ver también **Figura 5.20**) en casi un 100 % al final del cultivo a OD de 30%, mientras que en el cultivo a OD de 10% su concentración permaneció cercana a cero al final del cultivo, aunque no se agotó. A OD de 5% la glutamina se agotó a las 168 h. En el cultivo a 2%, OD la glutamina se agotó a las 288 horas, el final del cultivo. A 0% OD hubo una disminución en la concentración de glutamina del 25 %, el 17.5 % debido a degradación espontánea y 7.5 % debido al consumo celular. La cistina se agotó en los cultivos a 30, 10, 5 y 2 % de OD, mientras que su concentración disminuyó en un 16% en el cultivo a 0% de OD. La alanina fue producida al final de todos los cultivos, excepto en el cultivo a 0%, en el que la concentración de alanina permaneció constante. La producción de ácido glutámico siguió un patrón muy similar al de la alanina, aumentando su concentración hacia el final del cultivo. En el cultivo a 0% la concentración de ácido glutámico aumentó en un 10 %. No existe información en la literatura sobre el efecto del OD en el consumo o producción de aminoácidos y amonio. Las cinéticas de consumo/producción para todos los aminoácidos y los parámetros estequiométricos obtenidos en los cultivos en biorreactores instrumentados se reportan en el **Apéndice IV**.

En la **Figura 5.24** se muestra el efecto del OD sobre la máxima velocidad específica de crecimiento y las concentraciones celulares máximas. Se grafica la media y error de dos cultivos para los OD de 2, 10 y 30%. Uno de los cultivos a 30% OD fue el cultivo que se burbujeo al inicio del cultivo. En algunos casos la barra de error es menor que los símbolos utilizados para graficar. Con el fin de comparar estos cultivos con los cultivos en frasco T y frasco agitado, los valores obtenidos para estos cultivos se señalan con la flecha horizontal llena y la flecha horizontal vacía, respectivamente. Esta comparación se discutirá más adelante. El efecto del OD sobre la velocidad de crecimiento sigue un comportamiento tipo Monod, con una máxima velocidad específica de crecimiento de 0.033 h<sup>-1</sup>, y una K<sub>O<sub>2</sub></sub> de 1.91 %. En la literatura, no

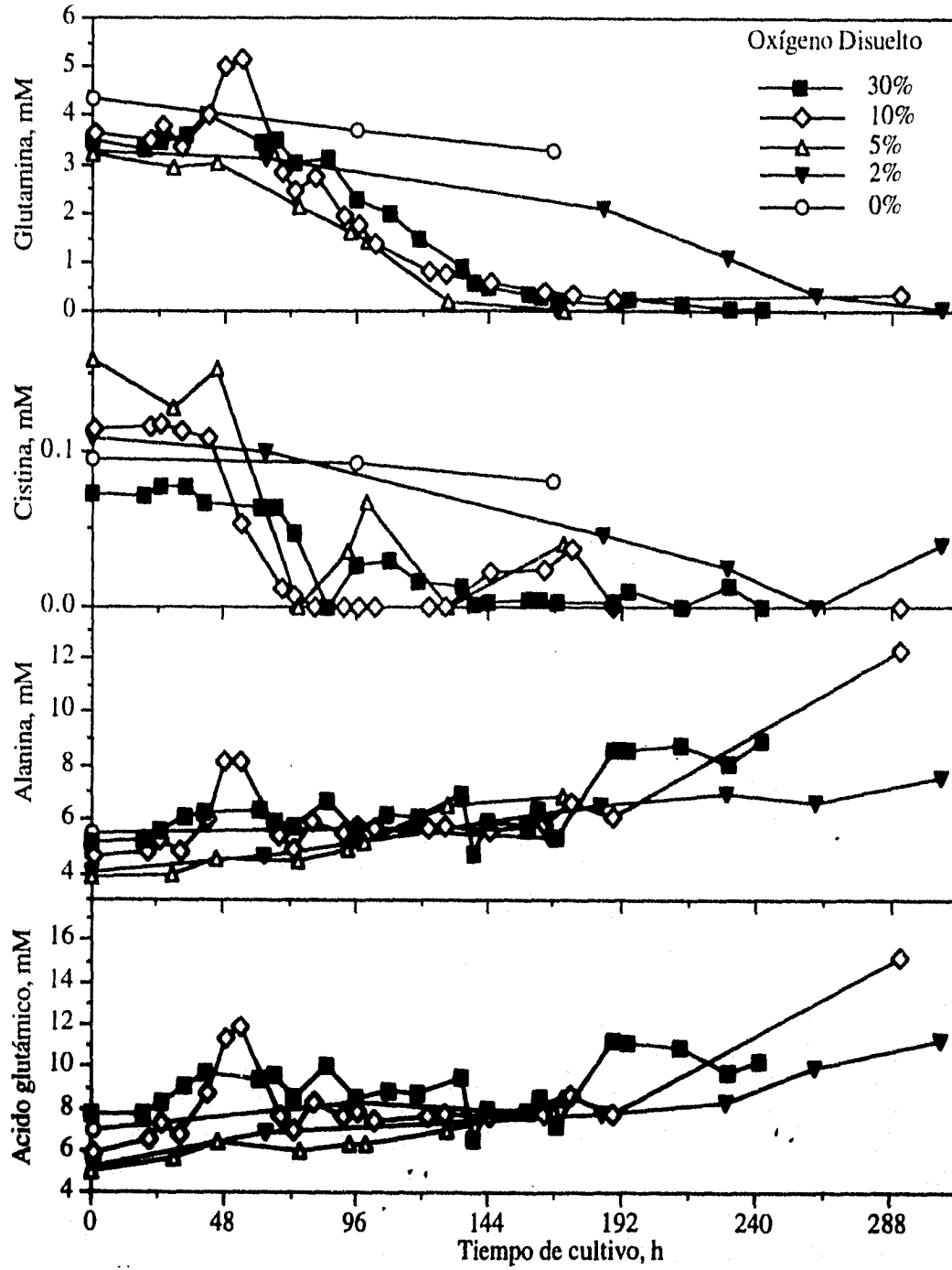
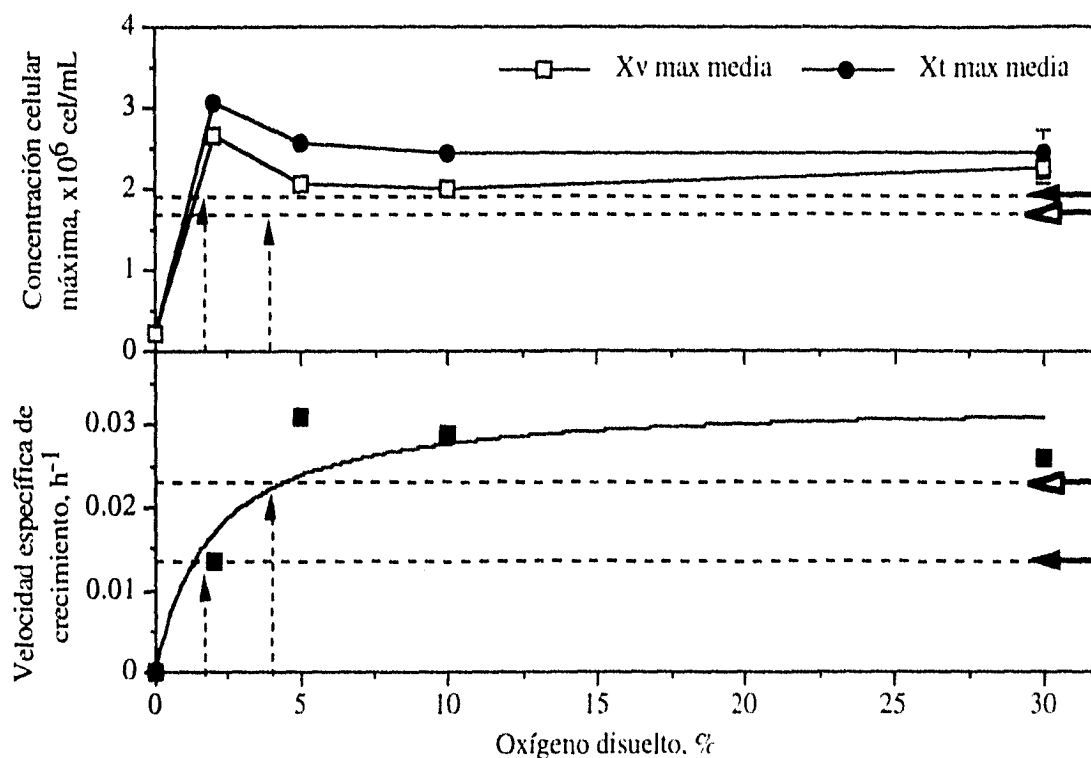


Figura 5.23 Efecto del OD en el consumo/producción de aminoácidos.



**Figura 5.24** Efecto del OD sobre la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima de cultivos de células de insecto. Media y barras de error para dos cultivos. En algunos casos la barra de error es menor que el símbolo utilizado para graficar. La línea continua en el panel de la velocidad de crecimiento sigue el modelo de Monod obtenido con estos datos, con una  $\mu_{\max}$  de  $0.033\text{h}^{-1}$  y una  $K_{O_2}$  de  $1.91\%$ . Las flechas horizontales vacías señalan la concentración celular viable máxima y la velocidad de crecimiento en cultivos en frascos agitados. Las flechas horizontales llenas muestran los mismos valores para los cultivos en frasco T. Las flechas verticales muestran los valores esperados en los cultivos en frasco T y frasco agitado, utilizando el OD aparente obtenido en la **Figura 5.25** (ver explicación en el texto).

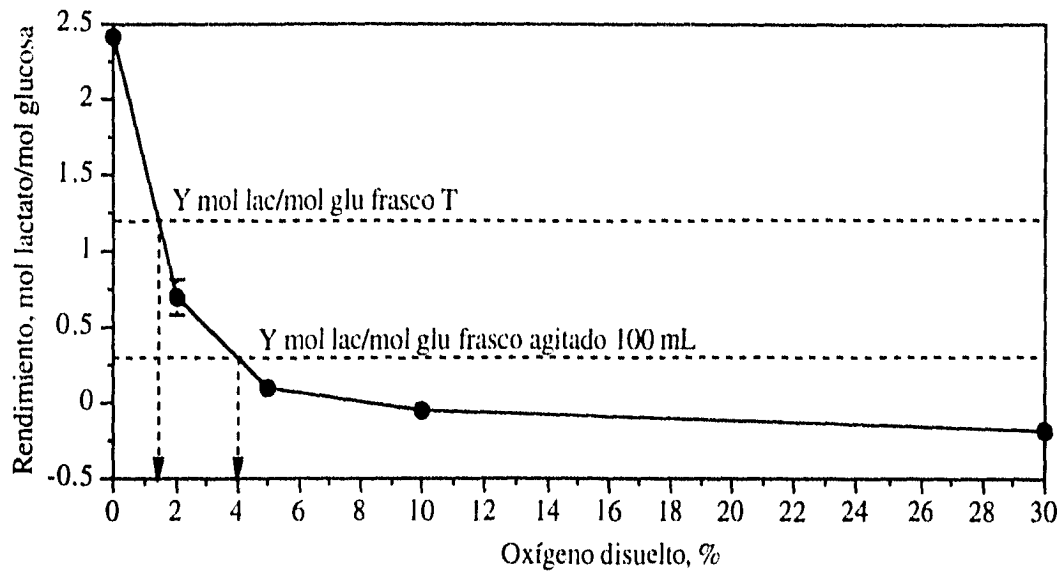
existen valores cinéticos sobre el efecto del OD en cultivos de células de insecto. A OD superiores a  $5\%$ , se obtiene una concentración celular óptima. Esto contrasta con lo reportado por Zhang et al.<sup>72</sup> que encontraron, en cultivo de células del gusano de seda, *Bombyx mori*, limitación del crecimiento por debajo del  $20\%$  OD, y un crecimiento óptimo por arriba del  $30\%$ . En células Sf-9, Jain et al.<sup>29</sup> reportaron en cultivos a OD de  $10\%$  y  $110\%$  una máxima velocidad específica de crecimiento  $25\%$  menor que la velocidad de crecimiento a OD de  $65\%$ . Sin embargo, dicho trabajo es sumamente cualitativo, pues no se reportaron las velocidades de crecimiento, las concentraciones celulares máximas, o las condiciones del cultivo. Hensler y Agathos<sup>26</sup>, por su parte, reportaron que no hay diferencias en la velocidad de crecimiento a OD de  $5, 10, 50$  y  $100\%$ , lo que coincide con lo reportado en este trabajo. A pesar de que a OD de



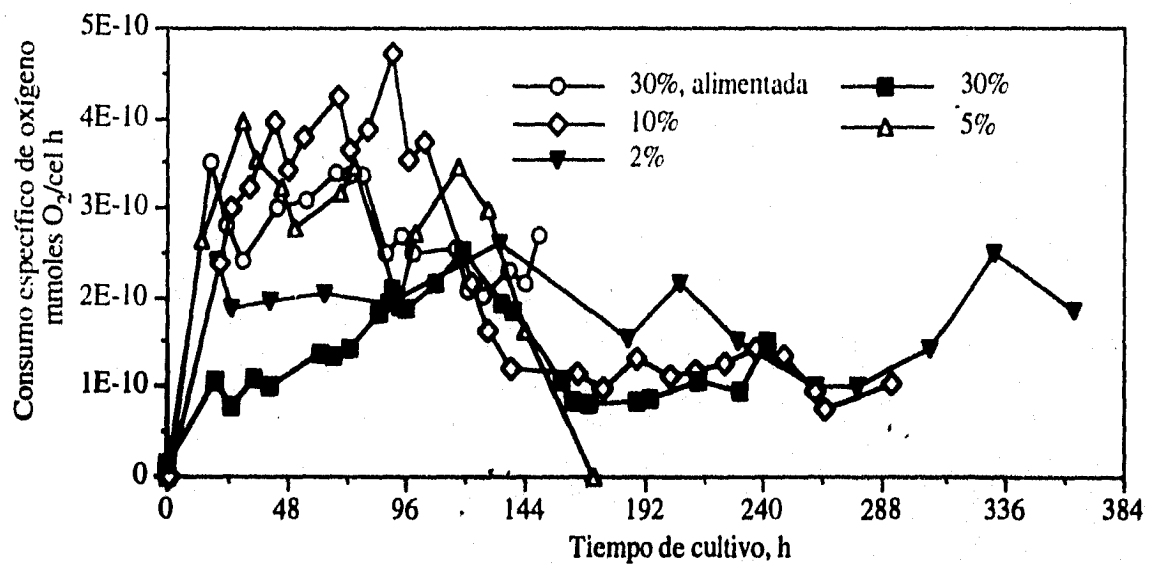
5% y a 2% ya hay producción de lactato, el cultivo a 5% presenta la mayor velocidad específica de crecimiento, mientras que los cultivos a 2% presentan la mayor concentración celular viable. Sin embargo, ya que en los cultivos a 2% la máxima velocidad específica de crecimiento es muy pequeña, el tiempo para alcanzar esta concentración celular es muy largo. En anaerobiosis no hubo crecimiento celular sino muerte progresiva de las células.

Se calculó el rendimiento de moles de lactato generadas por mol de glucosa consumida, y se encontró una relación inversa entre el OD y este rendimiento. En la **Figura 5.25** se observa como la producción de lactato por mol de glucosa está directamente relacionada con la disminución del OD. En el caso de los cultivos a 30 y 10%, no hay producción de lactato, sino consumo. Es por esto que el rendimiento de mol de lactato por mol de glucosa es negativo. En los cultivos a 5, 2 y 0%, hay producción de lactato, y el rendimiento de moles de lactato por mol de glucosa aumenta conforme el OD disminuye. Utilizando la relación entre la producción de lactato por mol de glucosa y el OD, se puede inferir el OD aparente al que se encuentran los cultivos en frascos agitados y los cultivos en frascos T. Por ejemplo, para frasco T se puede inferir que el OD aparente es equivalente a 1.8%, ya que el rendimiento experimental de lactato por glucosa fue de 1.2 mol/mol. Igualmente, para frascos agitados el OD aparente será equivalente a 4%, ya que el rendimiento experimental fue de 0.3 mol/mol. Utilizando estos valores de OD aparente para interpolar en la **Figura 5.24**, se obtiene una predicción bastante acertada de la velocidad específica de crecimiento y la concentración celular viable máxima en los cultivos en frasco T y frasco agitado. Esta relación se puede utilizar para obtener información sobre cómo se desarrollará el cultivo a partir del cálculo de rendimiento de lactato por glucosa.

El OD influye en la respiración celular, en la **Figura 5.26** se observan los consumos específicos de oxígeno de los cultivos a diferentes OD. El cultivo a 30%, que había sido burbujeado, muestra un comportamiento muy diferente a los demás. Por lo tanto, también se graficó el consumo del cultivo alimentado a 30% de OD antes de la primera alimentación, y se observa un comportamiento similar al de los cultivos a 10 y 5%. El cultivo a OD de 2% tiene un consumo de oxígeno menor al de los cultivos a OD mayores. Miller et al.<sup>40</sup> reportaron para hibridomas un consumo específico de oxígeno constante a OD superiores al 5%. No determinaron la VCO a OD menores. En cultivos de células de insecto, Hensler y Agathos<sup>26</sup> reportaron que no habían diferencias en la VCO de cultivos de Sf-9 a OD de 5, 10, 50 y 100 %. Sin embargo, tampoco evaluaron el efecto de OD menores. Jain et al.<sup>29</sup> reportaron, para cultivos de células de insecto durante la fase de producción de la proteína antistasina, una VCO a 10% OD de  $0.72-1.08 \times 10^{-10}$  mmol O<sub>2</sub>/cel h, a 65% OD de  $1.44-2.16 \times 10^{-17}$  mmol O<sub>2</sub>/cel h, y a



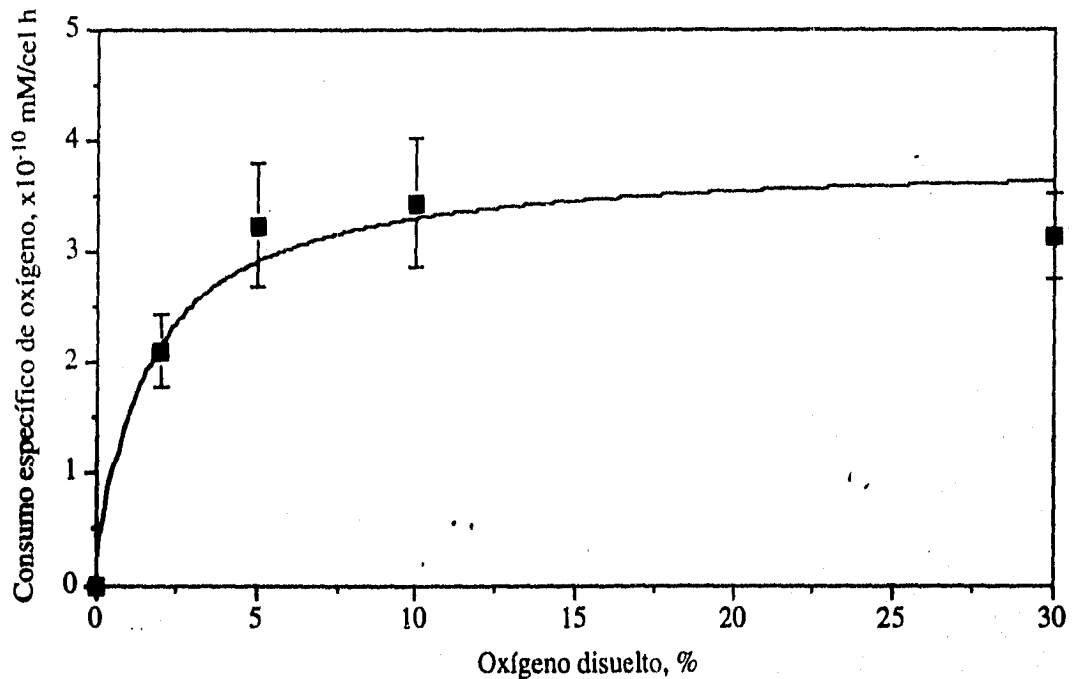
**Figura 5.25 Rendimientos de lactato por mol de glucosa a diferentes OD.** Se muestra en las barras de error la diferencia entre experimentos por duplicado (a 2, 10 y 30% OD). En algunos de los casos el símbolo es mayor que la barra de error. Las líneas punteadas se refieren a los rendimientos obtenidos en frasco agitado y en frasco T, y las flechas al OD aparente para estos cultivos.



**Figura 5.26 Consumo específico de oxígeno a diferentes OD**

110%, una VCO de  $3.24-4.16 \times 10^{-10}$  mmol  $O_2$ /cel h. Esto indica que la VCO a 65 % OD es el doble que al 10% OD, mientras que a 110% OD es 4 veces mayor que la VCO a 10 % OD. Esto señala la necesidad de evaluar el efecto del OD sobre la fase de producción de proteínas de una manera más extensa.

Con el fin de comparar los consumos de oxígeno a diferentes OD, se calculó la media del consumo específico de oxígeno y la desviación estándar durante la fase de crecimiento exponencial, donde teóricamente el consumo específico es constante. En la **Tabla 5.6** se muestran estos valores. Al graficar estos valores (**Figura 5.27**) se observa que el efecto del OD sobre la respiración tiene un comportamiento tipo Monod. Se encontró una  $qO_2$ max de  $3.82 \times 10^{-10}$  mmol/cel h y una  $kO_2$  de 1.57 % de OD. Los valores de Monod no habían sido previamente reportados en la literatura. Los valores de  $qO_2$  son similares a los reportados por Kamen et al.<sup>31</sup>, quienes reportaron un intervalo de 2 a  $2.9 \times 10^{-10}$  mmoles/cel h en medio sin suero a 40 +/- 10% OD. Asimismo, Reuveny et al.<sup>57</sup> reportaron una  $qO_2$  de  $2.193 \times 10^{-10}$  mmoles/cel h a 65% OD en cultivos con suero y  $3.9 \times 10^{-10}$  mmoles/cel h para cultivos sin suero.



**Figura 5.27 Efecto del OD en el consumo específico de oxígeno.** Las barras de error indican la variación del consumo específico de oxígeno y la línea indica la simulación efectuada con el modelo de Monod.

Tabla 5.6 Efecto del OD sobre el consumo específico de oxígeno

Oxígeno disuelto %	$q_{O_2}$ promedio $\times 10^{-10}$ mmoles/cel h	Desviación estándar $\times 10^{-10}$ mmoles/cel h
30 alimentada	2.976	0.3805
10	3.566	0.6688
5	3.228	0.5533
2	2.061	0.3534

La VCO puede ser utilizada para estimar en línea la concentración celular viable. Para comprobar esto se realizó una regresión lineal entre la VCO y la concentración celular en los cultivos. En la **Tabla 5.7** se muestra la ecuación obtenida y el coeficiente de correlación. En los cultivos a OD mayores de 5% se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a 0.95. Además, la pendiente y la ordenada en el origen fueron similares. Para generar una ecuación que se pudiera utilizar en general para los cultivos con OD superiores al 5%, se calculó la regresión lineal utilizando los cultivos a OD de 10% y 30% alimentado, ya que el cultivo al 30% no se puede comparar con los demás, como ya se ha mencionado. Además, se utilizaron únicamente los datos de la fase exponencial de los cultivos, donde se supone que el consumo de oxígeno es constante<sup>54</sup>. Los puntos y la recta generada se muestran en la **Figura 5.28**.

Utilizando la ecuación generada en la **Figura 5.28**, se estimó la concentración celular viable a partir del VCO para la segunda fermentación alimentada, cuyos datos no se utilizaron para obtener esta ecuación. En la **Figura 5.29** se observa la relación entre los datos reales y la estimación. La ecuación se utilizó para estimar  $X_v$  aún en la fase estacionaria y en la de muerte. La estimación de  $X_v$  fue muy buena durante la fase exponencial de crecimiento, y solamente tuvo una ligera desviación durante la fase estacionaria y la fase de muerte. De tal forma, es posible utilizarla para estimar en línea la concentración celular viable en los cultivos, lo que permite conocer inmediatamente el estado del cultivo.

Tabla 5.6 Efecto del OD sobre el consumo específico de oxígeno

Oxígeno disuelto %	$q_{O_2}$ promedio $\times 10^{-10}$ mmoles/cel h	Desviación estándar $\times 10^{-10}$ mmoles/cel h
30 alimentada	2.976	0.3805
10	3.566	0.6688
5	3.228	0.5533
2	2.061	0.3534

La VCO puede ser utilizada para estimar en línea la concentración celular viable. Para comprobar esto se realizó una regresión lineal entre la VCO y la concentración celular en los cultivos. En la **Tabla 5.7** se muestra la ecuación obtenida y el coeficiente de correlación. En los cultivos a OD mayores de 5% se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a 0.95. Además, la pendiente y la ordenada en el origen fueron similares. Para generar una ecuación que se pudiera utilizar en general para los cultivos con OD superiores al 5%, se calculó la regresión lineal utilizando los cultivos a OD de 10% y 30% alimentado, ya que el cultivo al 30% no se puede comparar con los demás, como ya se ha mencionado. Además, se utilizaron únicamente los datos de la fase exponencial de los cultivos, donde se supone que el consumo de oxígeno es constante<sup>54</sup>. Los puntos y la recta generada se muestran en la **Figura 5.28**.

Utilizando la ecuación generada en la **Figura 5.28**, se estimó la concentración celular viable a partir del VCO para la segunda fermentación alimentada, cuyos datos no se utilizaron para obtener esta ecuación. En la **Figura 5.29** se observa la relación entre los datos reales y la estimación. La ecuación se utilizó para estimar  $X_v$  aún en la fase estacionaria y en la de muerte. La estimación de  $X_v$  fue muy buena durante la fase exponencial de crecimiento, y solamente tuvo una ligera desviación durante la fase estacionaria y la fase de muerte. De tal forma, es posible utilizarla para estimar en línea la concentración celular viable en los cultivos, lo que permite conocer inmediatamente el estado del cultivo.

Tabla 5.7 Correlaciones entre VCO y Xv

Oxígeno disuelto %	Ecuación	Coefficiente de correlación
30	$X_v = 3.9 \text{ VCO} + 0.198$	0.987
30 alimentada	$X_v = 2.967 \text{ VCO} + 0.069$	0.992
10	$X_v = 2.144 \text{ VCO} + 0.104$	0.961
5	$X_v = 3.3 \text{ VCO} - 0.02$	0.876
2	$X_v = 6.2 \text{ VCO} + 0.073$	0.930

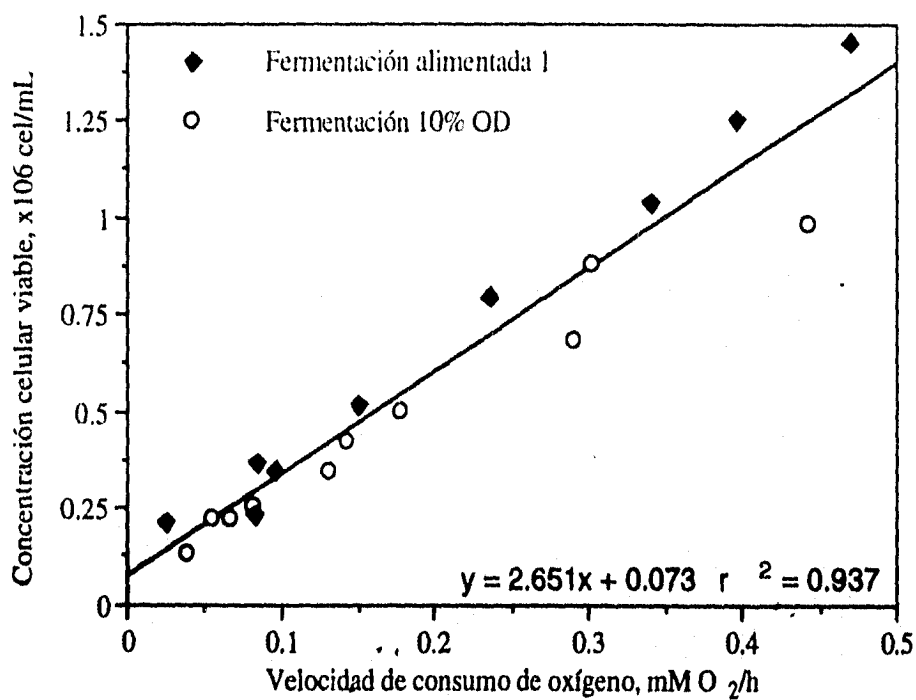
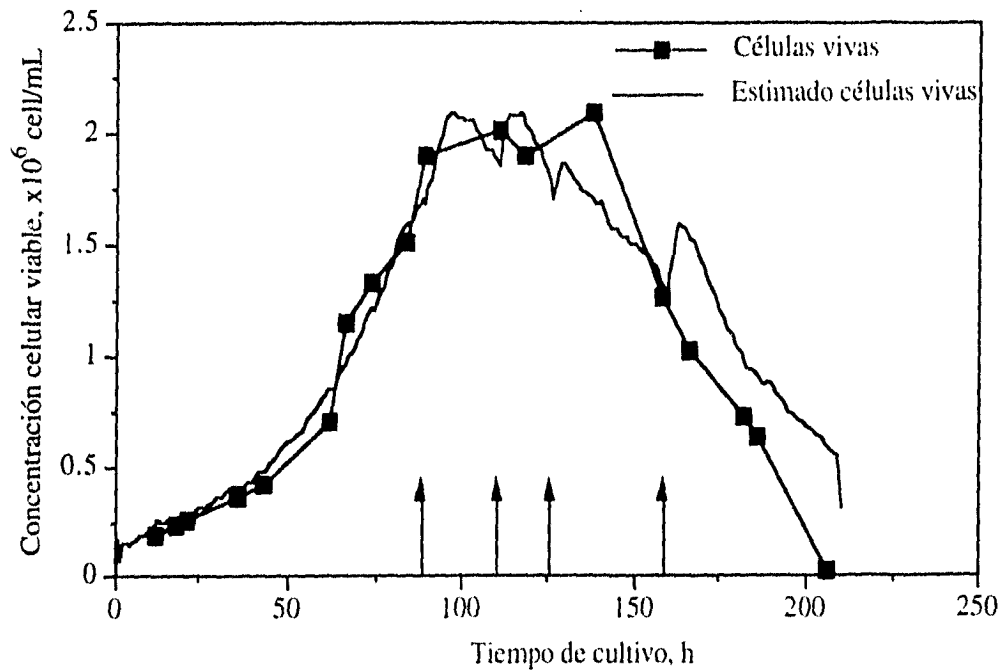


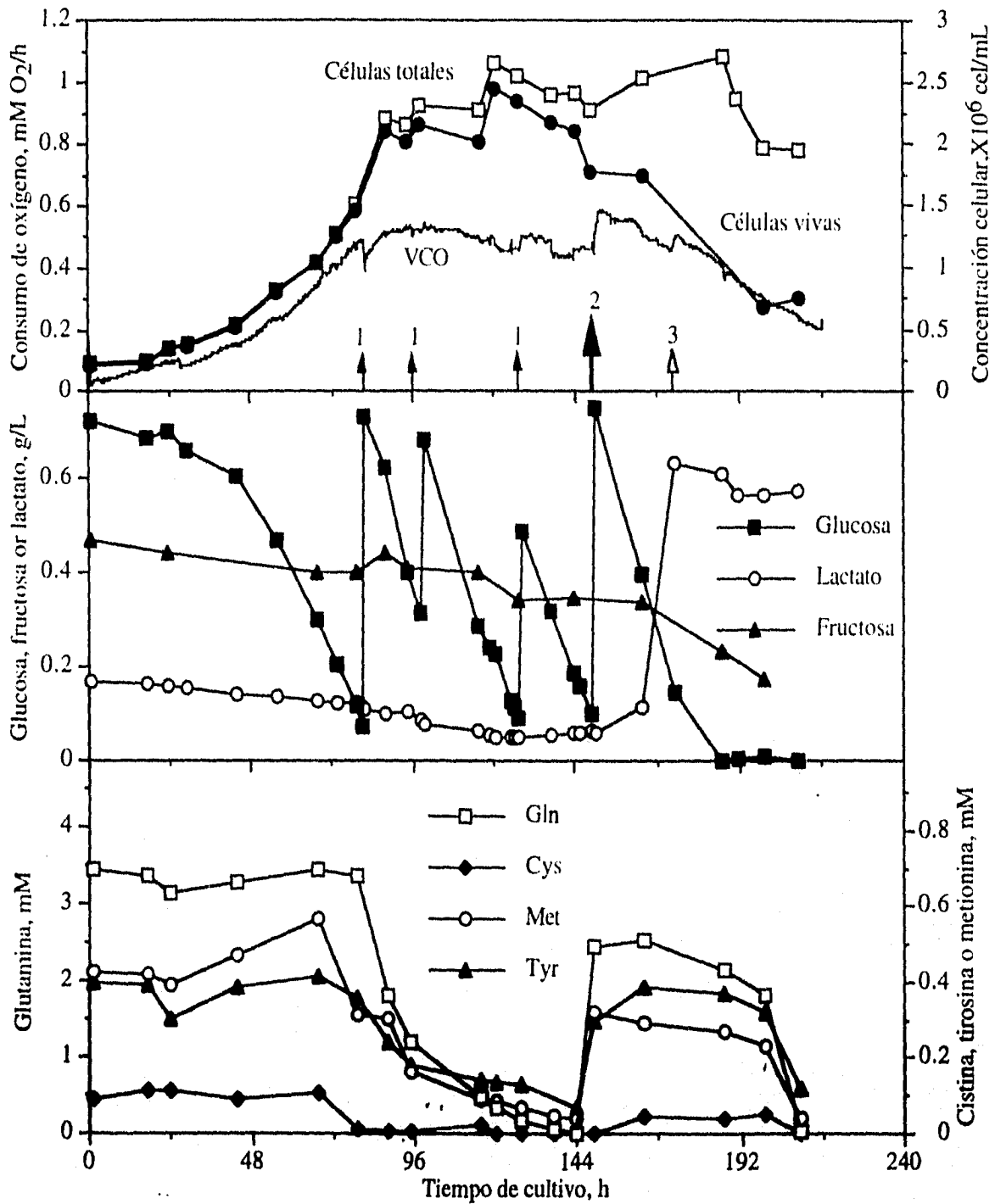
Figura 5.28 Regresión lineal entre la VCO y la concentración celular viable



**Figura 5.29** Estimación de la concentración celular viable a partir de la velocidad de consumo de oxígeno. Estimación realizada en el cultivo alimentado caso 2 (ver Figura 5.36). Las flechas señalan el momento de alimentación de los nutrientes, como se indica en la Figura 5.36.

## 5.7 Cultivos alimentados en biorreactor

Para confirmar la posibilidad de utilizar la VCO como una herramienta para determinar en línea el momento de alimentación de la glucosa, se realizó un cultivo a 30% OD (caso 1), en el que se alimentaron nutrientes en el momento en el que disminuyó la VCO. Las cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de este cultivo se encuentra en la Figura 5.30. En el momento en el que disminuyó la VCO, a las 81.4 horas de cultivo, se alimentaron 0.5 mL de una solución concentrada de glucosa (98g/L). Después de la alimentación, la concentración de glucosa en el reactor fue de 0.73 g/L y la VCO aumentó durante las siguientes doce horas y se estabilizó en 0.53 mM  $O_2/h$  a las 94.24 horas de cultivo, mientras que el valor anterior al agotamiento de la glucosa era de 0.48 mM  $O_2/h$ . Sin embargo, a las 7 horas después de la alimentación, el cultivo entró en fase estacionaria de crecimiento, a pesar de que la concentración



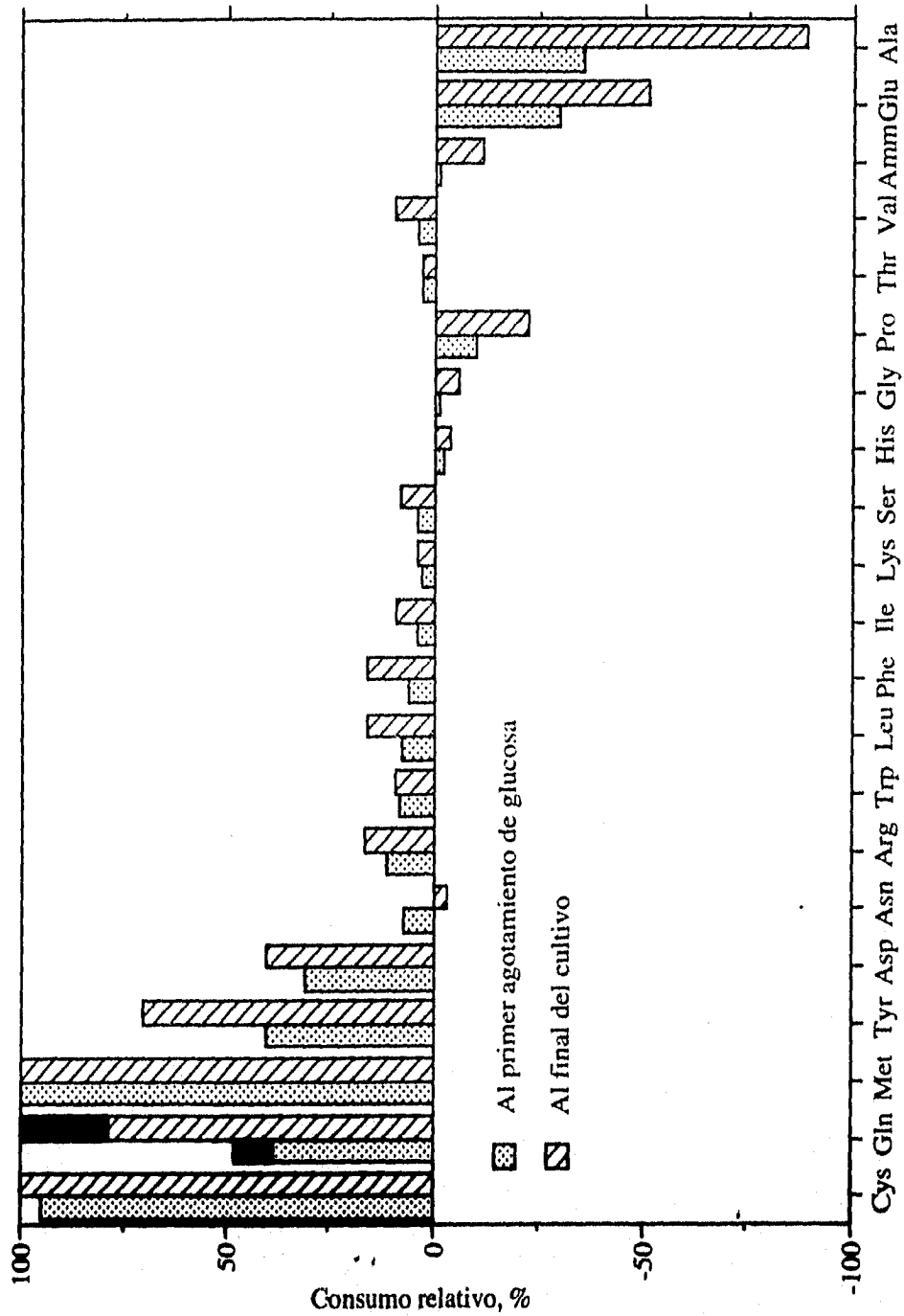
**Figura 5.30** Cinética de crecimiento y consumo de nutrientes en cultivo en lote alimentado caso 1. La flecha 1 se refiere a alimentación de glucosa, la 2 a alimentación de glucosa y los aminoácidos prolina, glutamina, tirosina, cistina y metionina. La 3 se refiere a alimentación de lactato.



de glucosa era de 0.63 g/L. Al obtener los resultados del análisis de aminoácidos encontramos que la cistina se agotó antes que la glucosa, por lo que pudo haber sido el nutriente responsable, además de la glucosa, de limitar el crecimiento celular. Ya que se mantuvieron concentraciones relativamente altas de glucosa en el cultivo, solo hubo un ligero consumo de lactato. La fructosa solo se consumió después del agotamiento de glucosa a las 187.15 horas (al final del cultivo).

Después de dos alimentaciones más de glucosa, que resultaron en la prolongación de la fase estacionaria del crecimiento, se realizó una alimentación de 68 mL de una solución (10X la concentración original en el medio) de glucosa y de los aminoácidos que se consumen con mayor rapidez (cistina, glutamina, prolina, metionina y tirosina). Se trataron de alcanzar las concentraciones iniciales de tales aminoácidos en el medio de cultivo. La solución de aminoácidos fue el 10% del volumen total del reactor. Después de la adición de la solución, la VCO aumentó, así como la concentración de células totales en el cultivo. No obstante, la concentración de células viables se mantuvo constante, probablemente debido a que las células ya se encontraban en fase de muerte y a la alta probabilidad de que otros nutrientes, además de aminoácidos y fuente de carbono, estuvieran limitando el crecimiento. Para confirmar que el aumento en la VCO era real, y no un artificio generado por el cambio de volumen, se reprodujeron las condiciones del reactor con agua libre de células a la que se alimentaron también 68 mL de agua con 0% de OD. Esto provocó un aumento del OD, con lo que la computadora tomó la acción de cerrar la válvula de oxígeno. Este efecto es el inverso al observado en el reactor al alimentar la solución de aminoácidos. Por lo tanto, el aumento en la VCO fue real. Todos los aminoácidos que se alimentaron fueron consumidos por las células. La cistina y la glutamina ya estaban agotadas en el momento de la alimentación y después de suplementarlos se volvieron a agotar al final del cultivo. La alimentación de aminoácidos provocó una producción de amonio y alanina, aunque nunca llegaron a niveles tóxicos para el cultivo. La cinética de consumo o producción de todos los aminoácidos en este cultivo, así como sus coeficientes estequiométricos, se muestran en el **Apéndice IV**. A las 173 horas, prácticamente al final del cultivo, se alimentó lactato con el fin de determinar si podía ser utilizado por las células como fuente de carbono en esta fase tardía de crecimiento. Como se puede observar, el lactato ya no fue utilizado por las células en esta etapa del cultivo.

En la **Figura 5.31** se muestra el consumo relativo de los aminoácidos antes del primer agotamiento de glucosa y al final del cultivo. El comportamiento fue muy similar al de la fermentación por lote. Al primer agotamiento de glucosa, la cistina se había consumido en un



**Figura 5.31 Consumo relativo de aminoácidos en cultivo alimentado caso 1.** Valores negativos se refieren a producción. Solo se consideró la degradación espontánea de glutamina, ya que el resto de los aminoácidos se degradan espontáneamente en menos de un 5%. La altura total de la columna corresponde a desaparición, la sección de la columna en negro corresponde a la degradación espontánea, y el resto de la columna corresponde al consumo.

90%. La metionina fue el segundo aminoácido de mayor consumo, seguido por la glutamina y la treonina. La alanina y el ácido glutámico se produjeron de forma muy similar al cultivo en lote. Una diferencia interesante es que en el cultivo alimentado hubo una menor producción de amonio (0.85% al primer agotamiento de glucosa y 11.7% al final del cultivo) que en el cultivo en lote a 30% OD (3.17% al agotamiento de glucosa y 61.61% al final del cultivo), a pesar de que en el primero se alimentó glutamina. Se debe considerar que el cultivo en lote había sido burbujeado, con la consiguiente muerte celular. Si comparamos este comportamiento con una fermentación por lote, a 10% OD (datos mostrados en Figuras 5.21, 5.23, y A.4) encontramos que se consumió amonio al agotamiento de glucosa (29.92 %) y se generó amonio al final del cultivo (29.25 %). Aparentemente, la generación de amonio está acoplada a la fase de muerte celular.

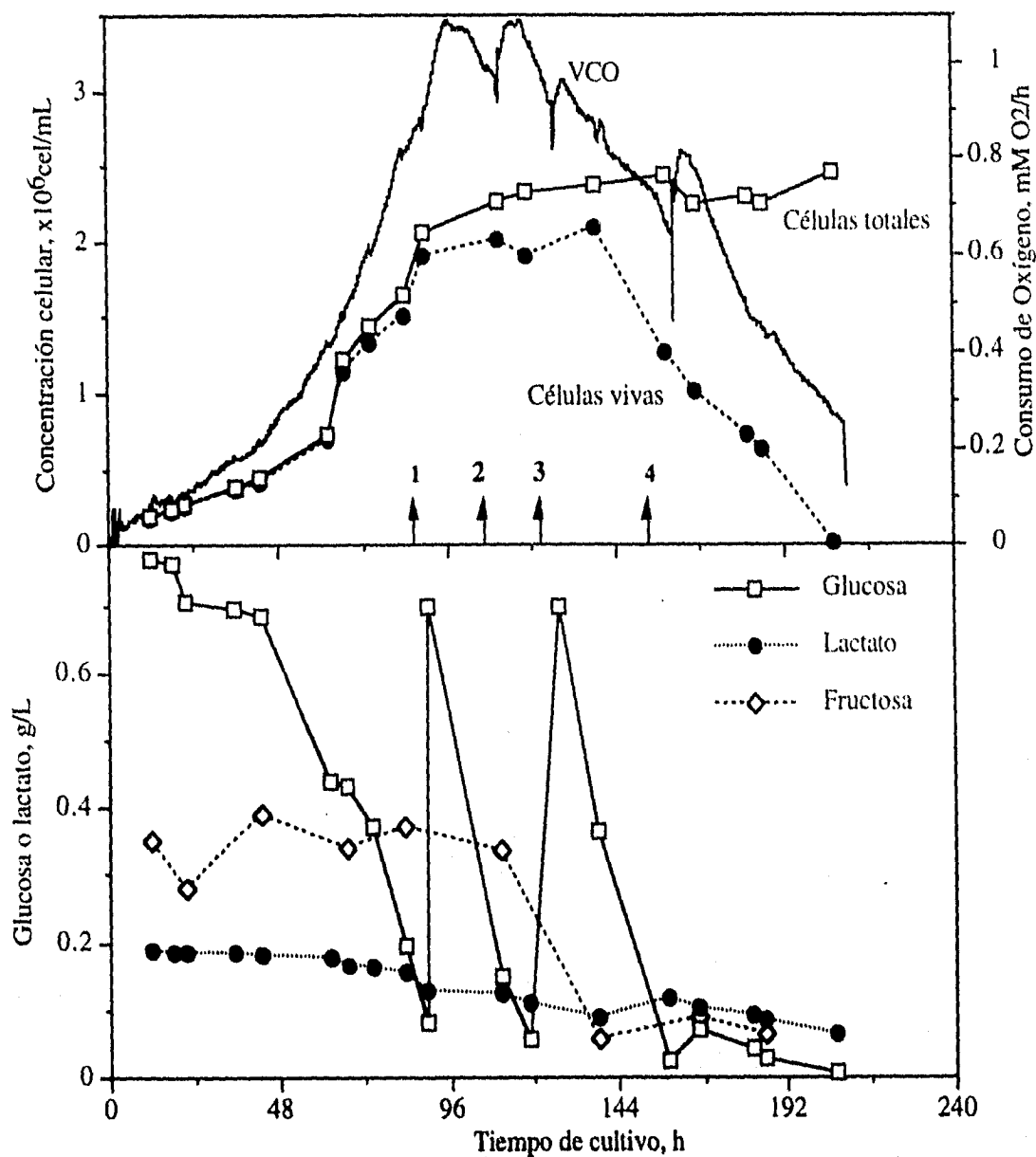
En la **Tabla 5.8** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima en este cultivo. La máxima velocidad específica de crecimiento fue similar a la del cultivo en lote ( $0.024 \text{ h}^{-1}$ ). En este cultivo hubo un aumento del 13% en la concentración celular viable máxima alcanzada y un aumento del 40% en la concentración celular máxima, comparando con los cultivos lote a 30 y 10% OD.

**Tabla 5.8** Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular viable máxima del cultivo alimentado caso 1

Velocidad de crecimiento, $\text{h}^{-1}$	0.026
$X_v$ máxima, $\times 10^6 \text{ cel/mL}$	2.446
$X_t$ máxima, $\times 10^6 \text{ cel/mL}$	2.72

$X_v$  significa concentración celular viable,  $X_t$  significa concentración celular total.

Se realizó otro cultivo en el que además de glucosa se alimentó cistina (caso 2). Para poder preparar soluciones concentradas de cistina se utilizó NaOH a una concentración de 1M para disolver la cistina, se agregó agua y se ajustó el pH de la solución con ácido clorhídrico 2M. En la **Figura 5.32** se muestra las cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes en este cultivo. Al hacer la alimentación de glucosa y cistina, la VCO continuó aumentando exponencialmente, a pesar de que el cultivo entró a la fase estacionaria de crecimiento. Después de la alimentación, la concentración celular viable aumentó en un 6.04% y la concentración celular total en un 9.8 %. Utilizando los coeficientes metabólicos para el consumo de aminoácidos que se obtuvieron en los cultivos lote (ver **Apéndice IV**) se calculó el momento



**Figura 5.32** Cinética de crecimiento y consumo de nutrientes en cultivo en lote alimentado caso 2. En la flecha 1 se alimentaron glucosa a la concentración presente en la formulación del medio (1X) y cistina a 3X. En la flecha 2 se alimentaron glutamina 1X y tirosina 1X. En la Flecha 3 se alimentaron glucosa 1X, metionina 1X y ácido aspártico 1X. En la flecha 4 se alimentaron 70 mL de medio fresco.

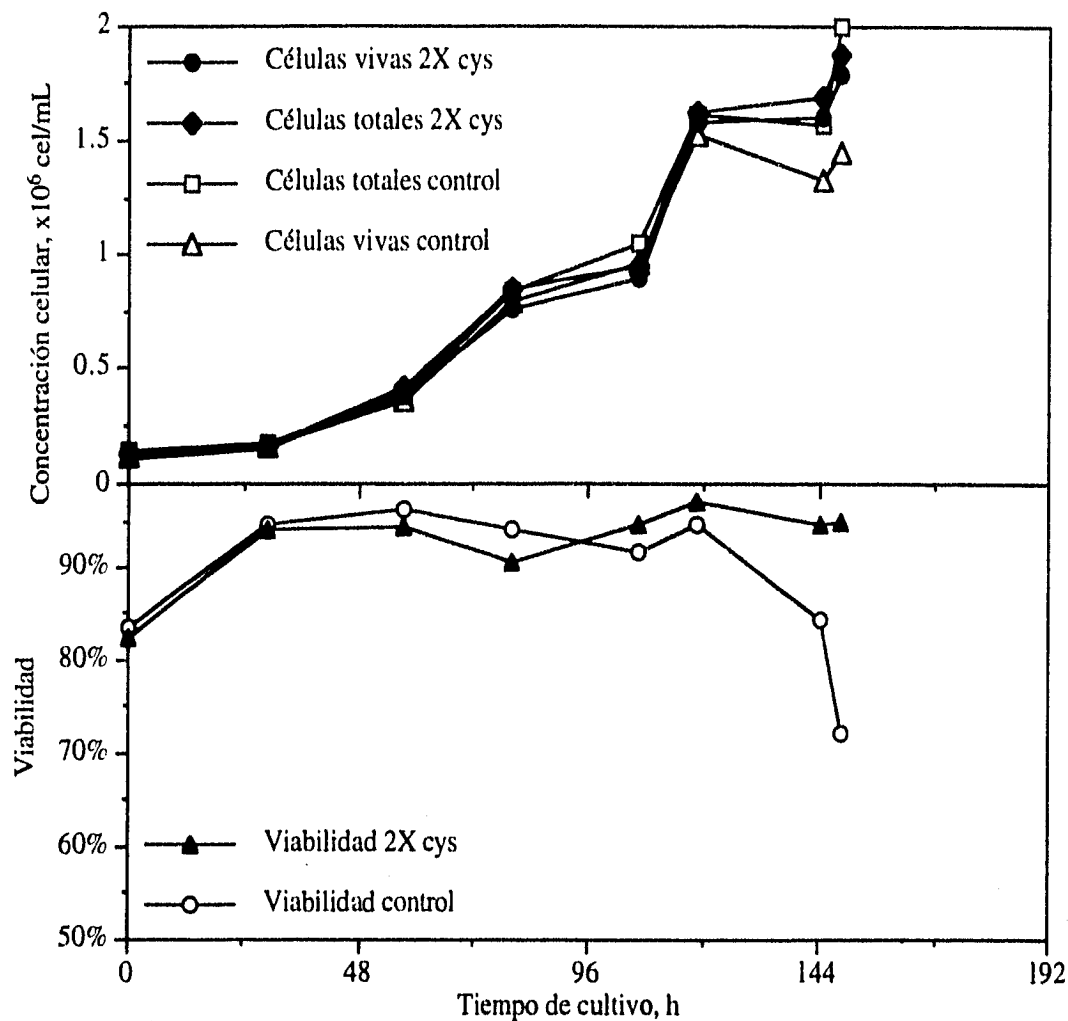
en que deberían de agotarse los aminoácidos glutamina, tirosina, metionina y ácido aspártico, y se alimentaron de acuerdo a este cálculo para evitar su agotamiento. En el segundo pulso se alimentaron glutamina y tirosina a su concentración original en el medio de cultivo. La VCO aumentó después de la alimentación y aumentó la concentración celular total. Sin embargo, la concentración celular viable no aumentó. En la tercera alimentación se agregaron metionina, ácido aspártico y glucosa, ya que esta última se había agotado de nuevo. La alimentación fue seguida por un aumento en la VCO y un ligero incremento en la concentración celular total. A las 160.4 horas de cultivo se alimentó con 70 mL de medio fresco, el 10 % del volumen de trabajo del reactor. Esta alimentación también provocó un aumento en la VCO. La concentración celular disminuyó ligeramente debido a la dilución. Sin embargo, la concentración celular aumentó hasta el valor anterior a la adición del medio. Durante el cultivo, el lactato se consumió ligeramente y la concentración de fructosa permaneció constante hasta que el nivel de glucosa bajó a menos de 0.4 g/L.

En la **Tabla 5.9** se reportan la máxima velocidad específica de crecimiento y las concentraciones celulares máximas obtenidas en este cultivo. La máxima velocidad específica de crecimiento fue similar a la del cultivo alimentado caso 1 y a los cultivos lote. La concentración celular viable máxima fue un 21% mayor que en las fermentaciones en lote. La concentración total máxima de células fue igual que la de las fermentaciones en lote.

**Tabla 5.9** Máxima velocidad específica de crecimiento y concentración celular máxima del cultivo alimentado caso 2

Velocidad de crecimiento, $h^{-1}$	0.030
$X_v$ máxima, $\times 10^6$ cel/mL	2.09
$X_t$ máxima, $\times 10^6$ cel/mL	2.45

Mercille y Massie<sup>39</sup> reportaron que el agotamiento de cistina induce la muerte celular programada (apoptosis) en cultivos de mielomas. Una vez que la apoptosis es inducida, el proceso de muerte celular es irreversible y no se interrumpe aun cuando se alimente cistina. Para explorar esta posibilidad realizamos cultivos en los que se aumentó la concentración de cistina a 2X al inicio del cultivo en frascos agitados. En la **Figura 5.33** se muestra la cinética de este cultivo. La concentración celular máxima alcanzada fue igual en el cultivo con 2X de cistina y el control. Sin embargo, después de que el cultivo llegó a la fase estacionaria, la viabilidad celular



**Figura 5.33 Efecto de la adición de cistina al inicio del cultivo**

en el cultivo con 2X de cistina se mantuvo por arriba del 90%, mientras que la viabilidad del control disminuyó gradualmente hasta el 70%. Aparentemente, la cistina no es utilizada para la generación de biomasa, sino que permitió el mantenimiento de las células ya existentes. Mercille y Massie<sup>39</sup> concluyeron que la falta de cistina en el medio de cultivo provoca una inhibición de la síntesis de proteínas, lo que induce la apoptosis.

## Capítulo VI

# Conclusiones

### 6.1 Conclusiones particulares

- Se realizó la caracterización exhaustiva de la línea celular de insecto Sf-9. Este trabajo es, hasta donde sabemos, el primero en el país sobre bioingeniería del cultivo de células de insecto.
- Se demostró que el cultivo de células de insecto en frascos agitados es la mejor opción a pequeña escala. A mayor escala, el cultivo en biorreactores instrumentados permite un estricto monitoreo del proceso y la aplicación de estrategias computarizadas de control y optimización del proceso. El cultivo en frasco T no es un buen método para la obtención de células de insecto, y es una opción solo cuando no se cuenta con la infraestructura necesaria para realizar cultivos en frasco agitado o biorreactor.
- Se determinó que la glucosa es la principal fuente de carbono para las células de insecto. Cuando su concentración es baja, se consumen otras fuentes de carbono, como la fructosa y el lactato. La sacarosa no es consumida por las células.
- Se determinó el efecto tóxico del lactato y el amonio. El lactato es tóxico a partir de 5 mM y el amonio a partir de 10 mM. Sin embargo, hubo crecimiento celular aún cuando ambas sustancias fueron adicionadas a 15 mM. No se debe descartar la posibilidad de que el amonio pueda ser tóxico en la fase de producción y/o afectar el procesado de las proteínas recombinantes.
- Se confirmó que el consumo de oxígeno está directamente relacionado con la concentración celular del cultivo y con el agotamiento de nutrientes. El agotamiento de glucosa provocó que la respiración celular permaneciera constante, mientras que el agotamiento de lactato o fructosa provocaron una caída en el consumo de oxígeno. El cultivo entró en fase de muerte poco tiempo después de que se detectó la disminución de la respiración.

- Se encontró que el OD tiene un efecto tipo Monod sobre la velocidad de crecimiento y el consumo específico de oxígeno. Para la velocidad de crecimiento, la  $k_{O_2}$  fue de 1.91 %, y la  $\mu_{max}$  fue de  $0.033 \text{ h}^{-1}$ ; para el consumo específico de oxígeno, una  $k'_{O_2}$  de 1.44 %, y una  $q_{O_2 \text{ max}}$  de  $3.68 \times 10^{-10} \text{ mmol O}_2/\text{cel h}$
- Se demostró que la producción de lactato esta relacionada con el OD. El rendimiento de lactato generada por glucosa consumida, permite inferir un OD aparente en cultivos no instrumentados, y predecir la concentración celular máxima y la velocidad de crecimiento.
- Se utilizó la VCO para alimentar nutrimentos en el momento de su agotamiento. Se obtuvo una concentración celular viable máxima 40% mayor. Los cultivos no volvieron a la fase de crecimiento exponencial, aunque se logró prolongar la fase estacionaria.
- Este trabajo constituyó en un avance importante hacia el desarrollo de estrategias computarizadas de control y monitoreo en línea de cultivos de células de insecto, aunque es necesario realizar más investigación con el fin de consolidar dichas estrategias.

## 6.2 Conclusión general

Antecedentes en el grupo de trabajo sobre el establecimiento de estrategias de control computarizado en cultivos de una línea particular de hibridomas fueron la motivación del presente estudio. Debido a la poca información sobre el metabolismo de células de insecto disponible, las hipótesis iniciales de trabajo se fundamentaron en los resultados obtenidos en cultivos de hibridomas. No obstante, durante el desarrollo de este estudio, se pudo constatar que existen diferencias importantes entre hibridomas y células de insecto Sf-9, que imposibilitan una extrapolación directa de las estrategias de control útiles de un sistema al otro. De tal forma, una de las aportaciones de este trabajo fue determinar las diferencias entre hibridomas y células de insecto Sf-9, y sus implicaciones en cuanto a políticas de operación y control de biorreactores.



## Bibliografía

1. Agathos, S. (1991) Mass production of viral insecticides. *Biotechnology for biological control of pests and vectors*. Ed. Maramosch, K. CRC Press. 217-235.
2. Aguilar-Aguila, A., Valentinotti, S., Galindo, E., Ramírez, O.T. (1993) Desarrollo de un sistema amigable y versátil para la adquisición de datos y control de bioreactores. *Biotecnología* 3 (5-6): S120-S129.
3. Bavarian, F., Fan, L., Chalmers, J. (1991) Microscopic visualization of insect cell-bubble interactions. I: Rising bubbles, air medium interface, and the foam layer. *Biotechnol. Prog.* 7: 140-150.
4. Bédard C., Kamen, A., Tom, R., Massie B. (1994) Maximization of recombinant protein yield in the insect cell/baculovirus system by one-time addition of nutrients to high-density batch cultures. *Cytotechnol.* 15: 129-138.
5. Bédard C., Tom, R., Kamen, A. (1993) Growth, nutrient consumption and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: Insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnol. Prog.* 9: 615-624.
6. Bishop, D. (1992) Baculovirus expression vectors. *Seminars in Virology* 3: 253-264.
7. Butler, M., Jenkins, H. (1989) Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. *J. Biotechnol.* 12: 97-110.
8. Cacciuttolo, M., Harrig, K., Tsao, E. Production of virus-like particles in insect cells derived from *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia ni*. AIChE Annual Meeting, Miami Fl. Paper No. 214j.
9. Caron, A., Archambault, J., Massie, B. (1990) High-level recombinant protein production in bioreactors using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 1133-1140.
10. Caron, W., Tom, L., Kamen, A., Massie, B. (1994) Baculovirus expression system scale-up by perfusion of high-density Sf-9 cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 881-891.
11. Chalmers, J., Bavarian, F. (1991) Microscopic visualization of insect cell-bubble interactions. II: The bubble film and bubble rupture. *Biotechnol. Prog.* 7: 151-158.
12. Claus, J., Remondetto, G., Guerrero, S., Demonte, A., Murguía, M., Marcipar, A. (1993) *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus replication in serum-free and serum reduced insect cell cultures. *J. Biotechnol.* 31: 1-15.
13. Clements, A., Grace, T. (1967) The utilization of sugars by insect cells in culture. *J. Insect Physiol.* 13: 1327-1332.

14. Dalili, M., Ollis, D. (1989) Transient kinetics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in serum limited cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 984-990.
15. Doyle, C., Butler, M. (1990) The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma. *J. Biotechnol.* **15**: 91-100.
16. Drews, M., Paalme, T., Vilu, R. (1995) The growth and nutrient utilization of insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.* **40**: 187-198.
17. Dyken, J., Sambanis, A. (1994) Ammonium selectively inhibits the regulated pathway of protein secretion in two endocrine cell lines. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 90-98.
18. Eyer, K., Oeggerli, A., Heinzle, E. (1995) On line gas analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine. *Biotechnol. Bioeng.* **45**: 54-62.
19. Ferrance, J., Goel, A., Ataai, M. (1993) Utilization of glucose and aminoacids in insect cell cultures: Quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 697-707.
20. Goldblum, S., Bae, Y., Hink, F., Chalmers, J. (1990) Protective effect of methylcellulose and other polymers on insect cells subject to laminar shear stress. *Biotechnol. Prog.* **6**: 383-390.
21. Gooche, C., Monica, T. (1990) Environmental effects on protein glycosylation. *Bio/Technol.* **8**: 421-427.
22. Goodwin, H. (1991) Replacement of vertebrate serum with lipids and other factors in the culture of invertebrate cells, tissue, parasites and pathogens. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **24A**: 470-478.
23. Grace, T., Brzostowski, H. (1966) Analysis of the aminoacids and sugars in an insect cell culture medium during cell growth. *J. Insect. Physiol.* **12**: 625-633.
24. Hansen H.A., Emborg C. (1994) Extra- and intracellular amino acid concentrations in continuous Chinese hamster ovary cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 560-564.
25. Hassell, T., Gleave, S., Butler, M. (1991) Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **30**: 29-41.
26. Hensler W., Agathos, S. (1994) Evaluation of monitoring approaches and effects of cultures conditions on recombinant protein production in baculovirus-infected insect cells. *Cytotechnol.* **15**: 177-186.
27. Higareda, A.E. (1994) Estrategias para optimizar la producción de anticuerpos monoclonales por cultivo de hibridomas en suspensión. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología. UACPyP/CCH. Universidad Nacional Autónoma de México.

28. Horiuchi, T., Marumoto, Y., Saeki, Y., Sato, Y., Furusawa, M., Konda, A., Maeda, S. (1987) High level expression of the human  $\alpha$ -interferon gene through the use of an improved baculovirus vector in the silk worm *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1573-1580.
29. Jain, D., Ramasubramanian, K., Gould, S., Seamans, C., Wang, S., Lenny, A., Silberklang, M. (1991) Production of Antistatin using the baculovirus expression system. In: Expression systems and processes for rDNA products. ACS Symposium Series No. 477. Hatch, R., Gooche, C., Moreira, A., Alroy, Y. *ACS Chs.* 97-110.
30. Jayme, W. (1991) Nutrient optimization for high density biological production applications. *Cytotechnol.* **5**: 15-30.
31. Kamen, A., Tom, R., Caron, A., Chavarie, C., Massie, B., Archambault, J. (1991) Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 619-628.
32. Kioukia, N., Nienow, A., Emery, A., Al-Rubeai, M. (1995) Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. *J. Biotechnol.* **38**: 243-251.
33. Koval, T., Suppes, D. (1990) pH dependency of cell attachment and growth at both clonal and subculture densities of cultured lepidopteran cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**: 665-670.
34. Léry, X., Fediere, G. (1990) A new serum free medium for lepidopteran cell culture. *J. Invert. Path.* **55**: 342-349.
35. Lindsay, D., Betenbaugh, M. (1992) Quantification of cell culture factors affecting recombinant protein yields in baculovirus-infected insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 614-618.
36. Martinelle, K., Haggstrom, L (1993) Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. *J. Biotechnol.* **30**: 339-350.
37. McLimans, W., Blumenson, L., Repasky, E., Ito, M. (1981) Ammonia loading in cell culture systems. *Cell Biology International Reports* **5**: 653-660.
38. McQueen, A., Bailey, J. (1991) Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: correlation with effects on intracellular pH. *Bioproc. Bioeng.* **6**: 49-61.
39. Mercille, S., Massie, B. (1994) Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 1140-1154.
40. Miller, W., Wilke, C., Blanch, H. (1988) Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioproc. Eng.* **3**: 113-122.
41. Mitsuhashi, J. (1989) Nutritional requirements of insect cells in vitro. In: Invertebrate Cell System Applications. Mitsuhashi, J. CRC Press, Inc. Pp. 3-20.

42. Mitsuhashi, J. (1991) Development of insect cell culture media for biotechnology. Proceedings of the 8th. International Conference on Invertebrate and Fish Tissue Culture. Pp. 83-89.
43. Mitsuhashi, J. (1982) Determination of essential amino acids for insect cell lines. In: Invertebrate Cell Culture Applications. Academic Press. 9-51.
44. Murhammer, D., Gochee, C. (1990) Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection. *Biotechnol. Prog.* **6**: 391-397.
45. Murhammer, D., Goochee, C. (1990) Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors. *Biotechnol. Prog.* **6**: 142-148.
46. Murhammer, D., Goochee, C. (1988) Scale up of insect cell cultures: protective effects of Pluronic F-68. *Bio/Technol.* **6**: 1411-1418.
47. Murhammer, D., Pfalzgraf, E. (1992) Effects of Pluronic F-68 on oxygen transport in an agitated, sparged bioreactor. *Biotechnol. Tech.* **6**: 199-202.
48. Nguyen, B., Jarnagin, K., Williams, S., Chan, H., Barnett, J. (1993) Fed-batch culture of insect cells: a method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. *J. Biotechnol.* **31**: 205-217.
49. Öhman, L., Ljunggren, J., Haggstrom, L. (1995) Introduction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 1-8.
50. Ozturk, S., Palsson, B. (1990) Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH and serum concentration. *Biotechnol. Prog.* **6**: 121-128.
51. Ozturk, S., Riley, M., Palsson, B. (1992) Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 418-431.
52. Qu, L., Phillips, J. (1993) Kinetic analysis and enhancement of antibody productivity in batch hybridoma culture. Presented in: National AIChE Meeting, St. Louis MO. Paper 100d7.
53. Radford, K., Bernard, A., Greenfield, P. (1995) Avoiding substrate limitation at high cell densities of infection: comparison of batch, perfusion and two-stage continuous bioreactor configurations. Presented in: Baculovirus and Insect Cell Gene Expression Conference, Pinehurst, NC.
54. Ramírez, O., Mutharasan, R. (1990) Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 839-848.
55. Ramírez, O., Mutharasan, R. (1992) The role of the plasma membrane fluidity of hybridomas: An insight into its shear protective mechanism. *Biotechnol. Prog.* **8**: 40-50.

56. Reitzer, L., Wice, B., Kennell, D. (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **254**: 2669-2676.
57. Reuveny, S., Kemp, C., Eppstein, L., Shiloach, J. (1992) Carbohydrate metabolism in insect cell cultures during cell growth and recombinant protein production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **665**: 230-237.
58. Reuveny, S., Kim, Y., Kemp, C., Shiloach, J. (1993) Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 619-623.
59. Roberts, P. (1984) Growth of insect cells in recycled medium and the use of various serum supplements. *Biotechnol. Lett.* **6**: 633-638.
60. Roy, P., French, T., Erasmus, B. (1992) Protective efficacy of virus-like particles for blue tongue disease. *Vaccine* **10**: 28-32.
61. Scott, R., Blanchard, J., Ferguson, C. (1992) Effects of oxygen on recombinant protein-production by suspension-cultures of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) insect cells. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 798-804.
62. Shapiro, M. (1982) In vivo mass production of viral pesticides. In: Microbial and Viral Pesticides. Ed. E. Kurstak Marcel Dekker Inc. Pp. 465-492.
63. Slocum, R., Cummings, J. (1991) Amino acid analysis of physiological samples. In: Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: a Laboratory Manual Ed. Wiley-Liss Inc. Pp. 87-126.
64. Smith, G., Summers, M., Fraser, M. (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 2156-2165.
65. Stavroulakis, D., Kalogerakis, N., Behie, L., Latrou, K. (1991) Kinetic data for the BM-5 insect cell line in repeated-batch suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 116-126.
66. Tremblay, G., Mejia, N., MacKenzie, R. (1992) The NADP- dependent methylenetetrahydrofolate synthetase is not expressed in *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 8281-8285.
67. van Lier, F., van Duijnhoven, G., de Vaan, M., Vlak, J., Tramper, J. (1994) Continuous  $\beta$ -galactosidase production in insect cells with a p10 gene based baculovirus vector in two stage bioreactor system. *Biotechnol. Prog.* **10**: 60-64.
68. Vaughn, J., Goodwin, R., Tomkins, G., McCawley, P. (1979) The establishment of two cell lines from the insect (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro* **13**: 213-217.
69. Wang, M., Vakharia, V., Bentley, W. (1993) Expression of epoxide hydrolase in insect cells: A focus on the infected cell. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 240-247.
70. Wang, M., Wester, K., Bentley, W. (1993) Glutamine determination in insect cell culture media. *Biotechnol. Tech.* **7**: 841-846.

71. Wang, M.Y., Kwong, S. and Bentley, W.E. (1993) Effects of oxygen/glucose/glutamine feeding on insect cell baculovirus protein expression: A study on epoxide hydrolase production. *Biotechnol. Prog.* **9**: 355-361.
72. Zhang, J, Kalogerakis, N, Behie, L. (1994) Optimization of the physiochemical parameters for the culture of *Bombyx mori* insect cells used in recombinant protein production. *J. Biotechnol.* **33**: 249-258.

Apéndice I

**Estabilidad de aminoácidos en medio TNM-FH**

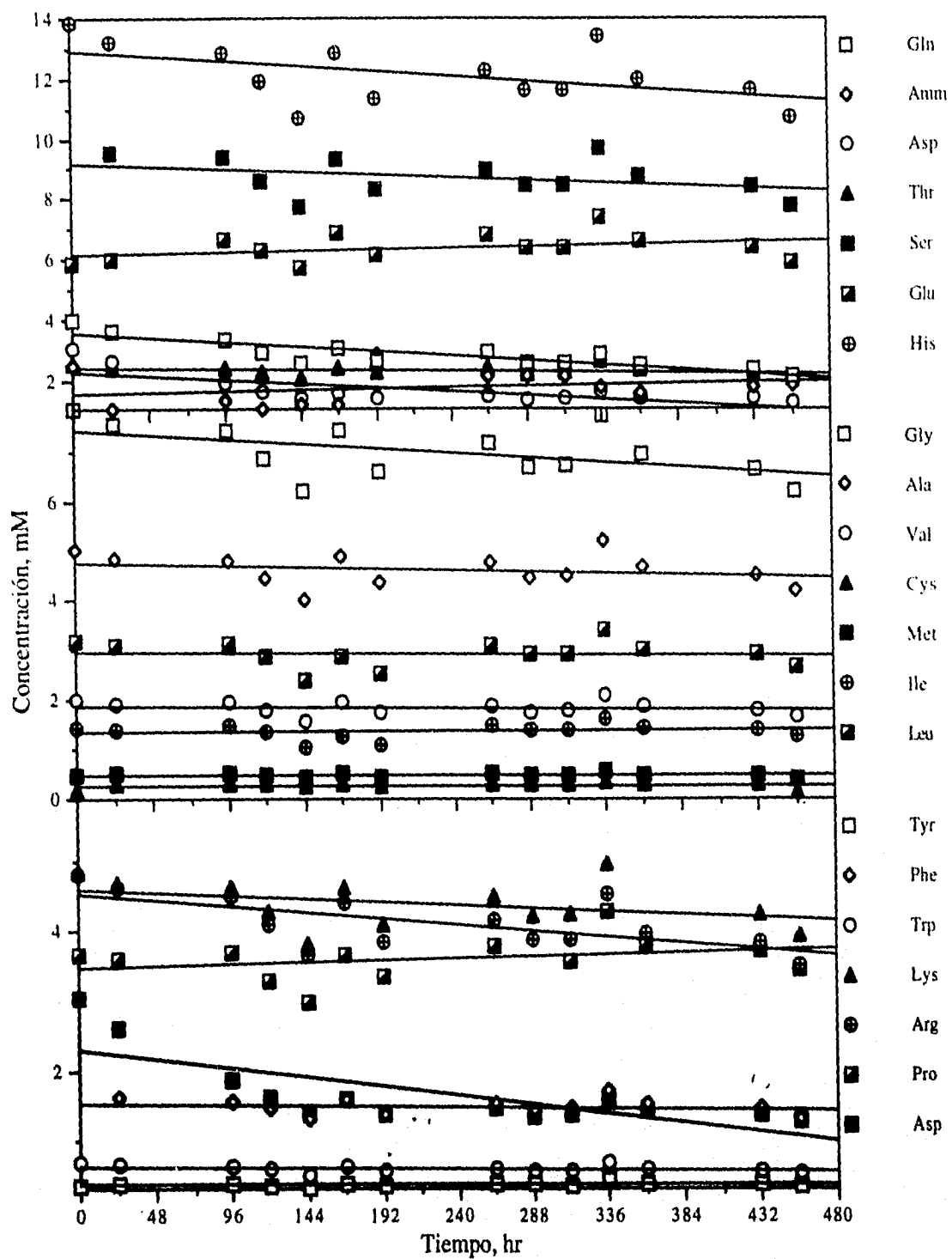


Figura AI.1 Degradación espontánea de aminoácidos en medio TNM-FH sin células

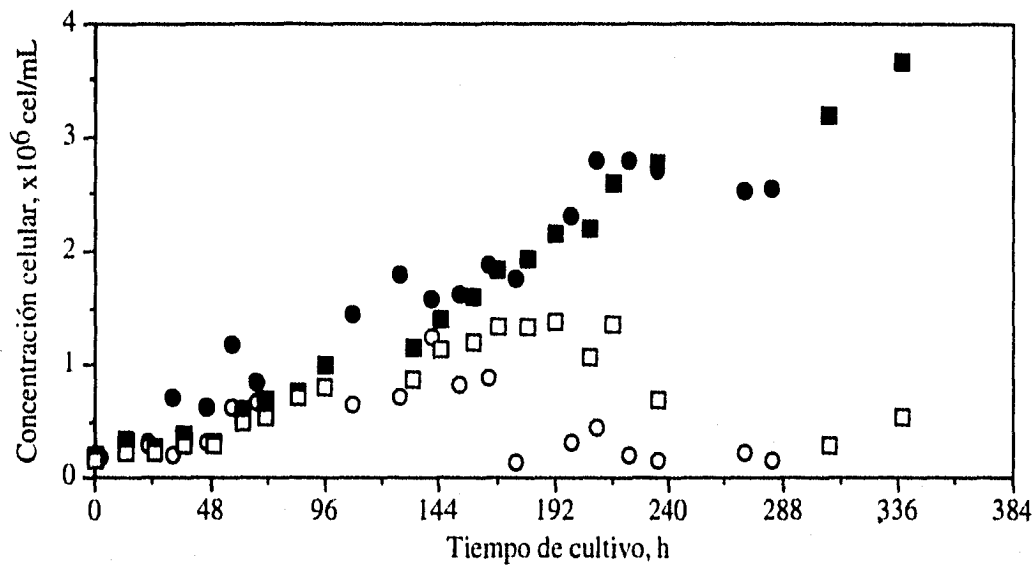


**Tabla A1.1 Aminoácidos estables y su concentración media y desviación estándar después de 450 h**

Aminoácido	Media mM	Desviación estándar mM +/-
Thr	2.33	0.166
Ser	8.71	0.634
Glu	6.38	0.464
Ala	4.62	0.324
Val	1.83	0.141
Gly	6.19	1.014
Ile	1.36	0.151
Leu	2.93	0.266
Tyr	0.38	0.026
Lys	4.33	0.419
Pro	3.61	0.308

**Apéndice II**

**Cultivos estáticos**



**Figura AII.1 Reproducibilidad de los cultivos estáticos.** Se muestran cinéticas de dos cultivos. Los símbolos vacíos representan células viables y los llenos células totales. Se aprecia que la mayor reproducibilidad se obtuvo durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que en la fase de muerte hubo una dispersión considerable. Esto puede obedecer al volumen pequeño en el frasco al final del cultivo, lo que dificulta obtener muestras homogéneas en frasco T.

**Tabla AII.1 Coeficiente metabólico específico y rendimiento aparente de aminoácidos y amonio en cultivo estático antes del agotamiento de glucosa**

Aminoácido	qi μmol/x10 <sup>9</sup> cel h	Yap x10 <sup>9</sup> cel/mmol
Cistina	2	4.130
Asp	22	0.63
Met	6	2.45
Gln	27	0.5
Amm	9	1.630
Tyr	5	3.03
Trp	5	2.62
Arg	4	0.35
Phe	17	0.84
Leu	14	1.02
His	128	0.11
Gly	70	0.2
Lys	45	0.31
Ser	89	0.16
Val	13	0.71
Ile	31	0.46
Thr	22	0.63
Asn	---	---
Pro	---	---
Ala	-35	0.4*
Glu	-52	0.27*

qi significa coeficiente metabólico, Yap significa rendimiento aparente.

\* Se refiere a aminoácidos producidos. En el caso de asparagina y prolina no hubo un consumo constante durante la fase de crecimiento exponencial, por lo que no se reporta el coeficiente metabólico ni el rendimiento. Cabe resaltar que esta información para cultivos estáticos no se ha encontrado en la literatura.

**Tabla AII.2 Coeficiente metabólico específico y rendimiento aparente de aminoácidos y amonio en cultivo estático durante el consumo de lactato**

Aminoácido	qi μmol/x10 <sup>9</sup> cel h	Y aparente x10 <sup>9</sup> cel/mmol
Cistina	---	---
Asp	1	7.14
Met	---	---
Gln	5	1.37
Amm	-18	0.39*
Tyr	---	---
Trp	---	---
Arg	-11	0.63*
Phe	-5	1.45*
Leu	-9	0.78*
His	-41	0.17*
Gly	22	0.78*
Lys	13	0.53*
Ser	23	0.3*
Val	---	---
Ile	-9	0.78*
Thr	-7	0.94*
Asn	-5	1.56*
Pro	3	2.7*
Ala	-22	0.32*
Glu	-24	0.3*

qi significa coeficiente metabólico, Y<sub>p</sub> significa rendimiento aparente.

\* Se refiere a aminoácidos producidos

## AII.1 Efecto del amonio en cultivos de células de insecto

**Tabla AII.3 Efecto del amonio en el rendimiento en cultivo estático**

Concentración, mM	Control	0.5	1	3	5	6	10	15
Yap, $\times 10^6$ cel v/ g glucosa	1280	2291	1746	1988	1130	2032	1070	1224

Yap significa rendimiento aparente.

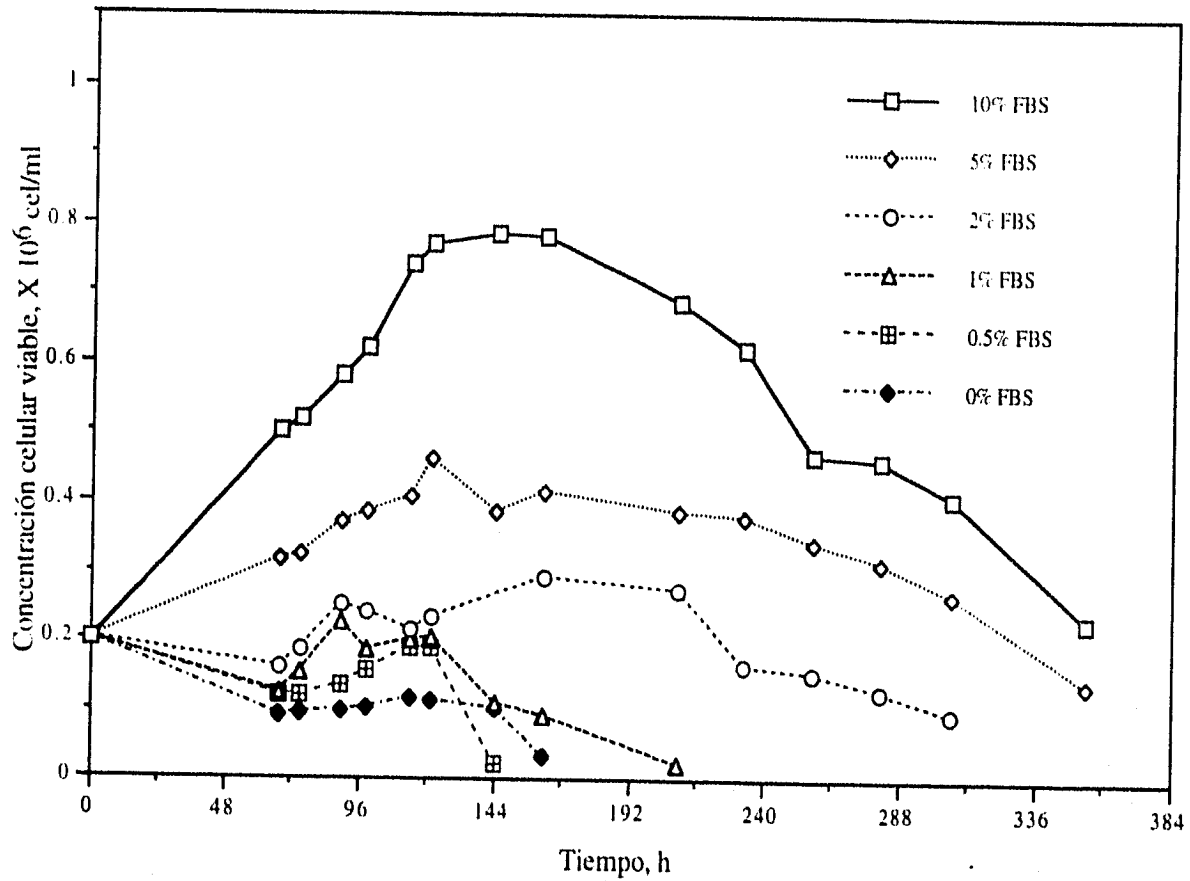
## AII.2 Efecto del lactato en cultivos de células de insecto

**Tabla AII.4 Efecto de la adición de lactato en el rendimiento en cultivo estático**

Concentración, mM	Control	5	10	15
Yap $\times 10^6$ cel v/g glucosa	970	1060	400	590

Yap significa rendimiento aparente

**AII.3 Efecto de la concentración de suero fetal bovino.**



**Figura AII.2 Efecto del suero fetal bovino en cultivos estáticos**

**Apéndice III**

**Cultivos en frascos agitados**



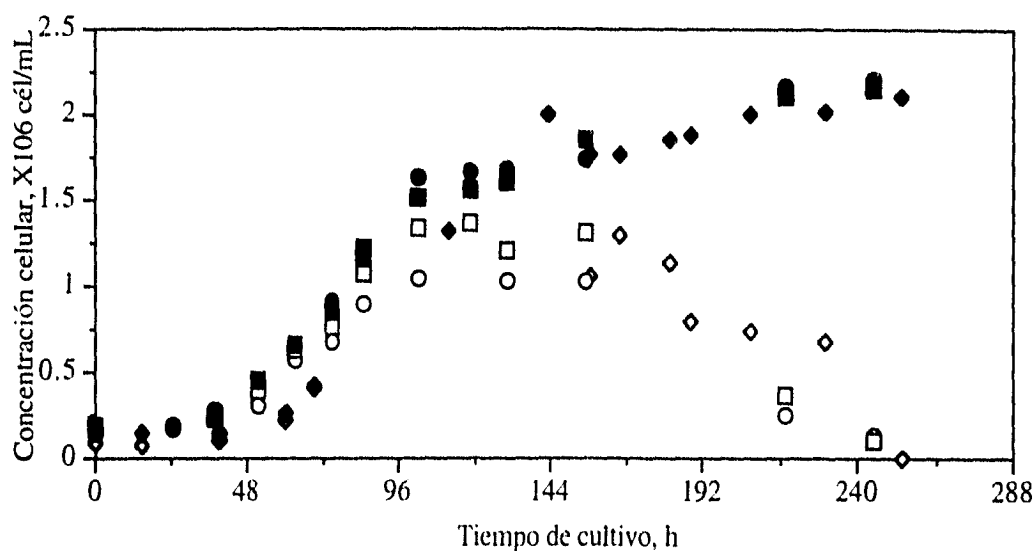


Figura AIII.1 Reproducibilidad de cultivos en frascos agitados. Símbolos vacíos representan células viables, símbolos llenos representan células totales

Tabla AIII.1 Rendimiento de glucosa de cultivos en suspensión. Media y desviación estándar de tres cultivos.

Yap x10 <sup>6</sup> cel/g glucosa	Células vivas	1389+/-108
	Células totales	1709+/-209
qi mg glucosa/x10 <sup>6</sup> cel h	Células vivas	0.018+/-0.002
	Células totales	0.015+/-0.001

qi significa coeficiente metabólico, Yap significa rendimiento aparente, qi significa coeficiente metabólico

Tabla AIII.2 Tasa metabólica específica y rendimiento aparente de aminoácidos y amonio en cultivo en suspensión en frascos agitados

Aminoácido	qi μmol/x10 <sup>9</sup> cel h	Yap x10 <sup>9</sup> cel/mmol
cistina	4	5.24
Gln	40	0.605

qi significa coeficiente metabólico, Yap significa rendimiento aparente.

### AIII.1 Cultivos con diferentes concentraciones de glucosa

Con el fin de determinar el efecto de diferentes concentraciones de glucosa en cultivos de Sf-9, se realizaron cultivos sin glucosa y con el doble de glucosa que el medio TNM-FH. El medio fue preparado en el laboratorio con la formulación del medio comercial. Tanto el control como el cultivo sin glucosa se realizaron con este medio. Solo se realizó un cultivo de cada experimento. Al cultivo sin glucosa se le adicionó 0.6 g/L de lactato (TNM-FH/glucosa<sup>-</sup>), que como ya se ha mencionado, es utilizado como fuente de carbono por las células de insecto.

Debido a la glucosa presente en el SFB, hubo glucosa al inicio del cultivo sin glucosa añadida, en una concentración de 0.097 g/L. No hubo diferencia entre las máximas velocidades específicas de crecimiento de ambos cultivos (0.021 h<sup>-1</sup> para el control y 0.026 h<sup>-1</sup> para el cultivo sin glucosa). En la **Figura AIII.2** se muestra la comparación del crecimiento de ambos cultivos. La concentración celular viable máxima alcanzada en el cultivo TNM-FH/glucosa<sup>-</sup> fue de 0.88 x 10<sup>6</sup> cel/mL, mientras que en el control fue de 0.84 x 10<sup>6</sup> cel/mL, prácticamente igual. En el cultivo TNM-FH/glucosa<sup>-</sup> las células pasaron a fase de muerte a partir del agotamiento de lactato.

Para calcular el rendimiento a partir de que la concentración de glucosa es menor de 0.2 g/L, es necesario considerar que hay consumo simultáneo de glucosa, fructosa y lactato. Se calculó el rendimiento con base en los mol de carbono de las tres fuentes utilizadas simultáneamente. En la **Tabla AIII.3** se muestran los rendimientos por mol de carbono en el cultivo control y el cultivo sin glucosa. En el caso del cultivo sin glucosa, hubo consumo de fructosa y lactato desde el principio del cultivo, por lo que solo se calculó el rendimiento por mol de carbono de la fructosa, glucosa y lactato. Los rendimientos de carbono para el cultivo control fueron mucho mayores que los del cultivo sin glucosa con lactato.

**Tabla AIII.3 Rendimientos por mol de carbono de cultivo sin glucosa y cultivo control en frascos agitados**

		X <sub>v</sub>	X <sub>t</sub>
Y <sub>ap</sub> , x10 <sup>9</sup> cel/ mol C de glucosa	TNM-FH	143.94	147.17
Y <sub>ap</sub> , x 10 <sup>9</sup> cel/mol C glucosa+fructosa+lactato	TNM-FH	67.22	109.38
	TNM-FH/glucosa <sup>-</sup>	26.49	39.63

Y<sub>ap</sub> significa rendimiento aparente.

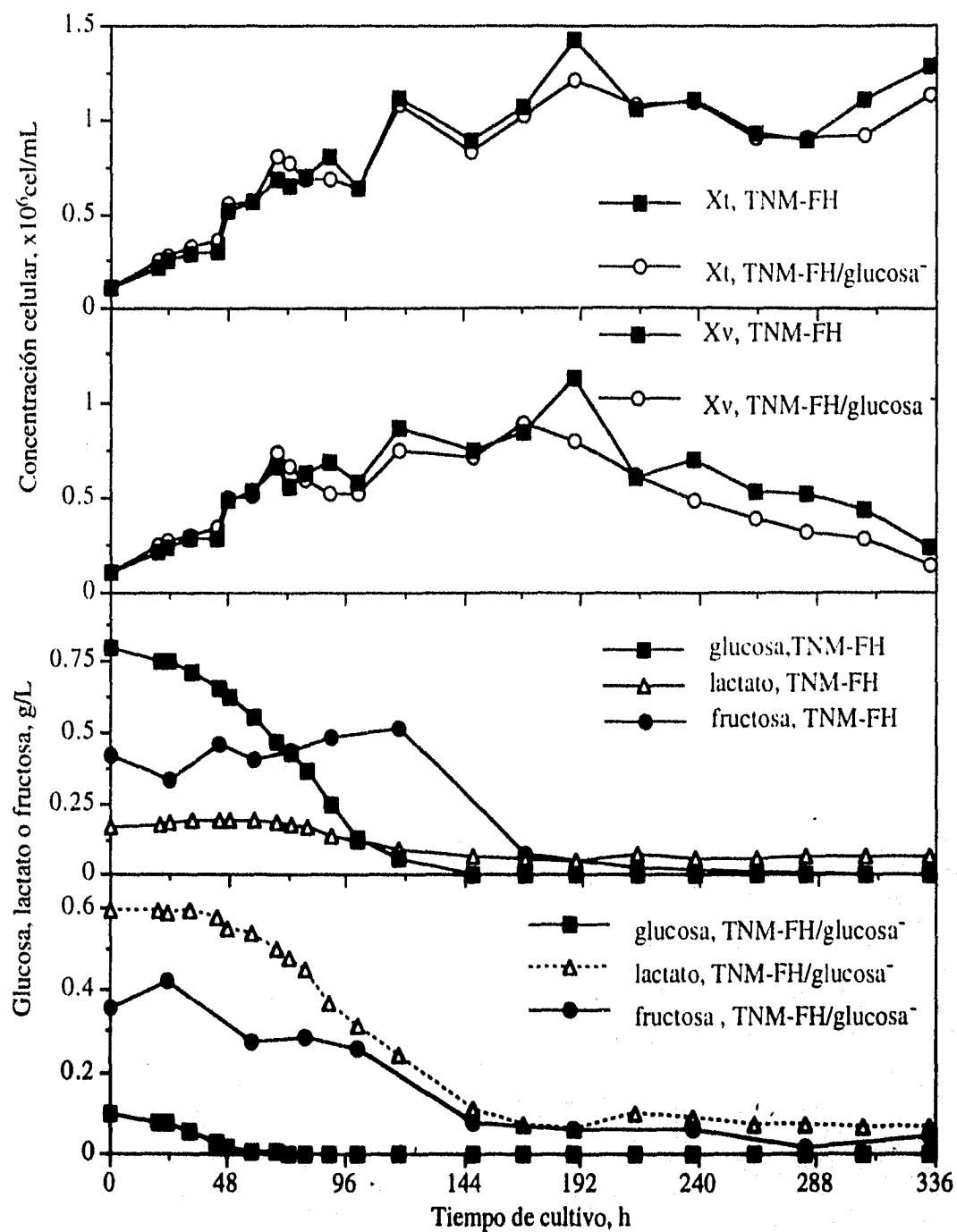
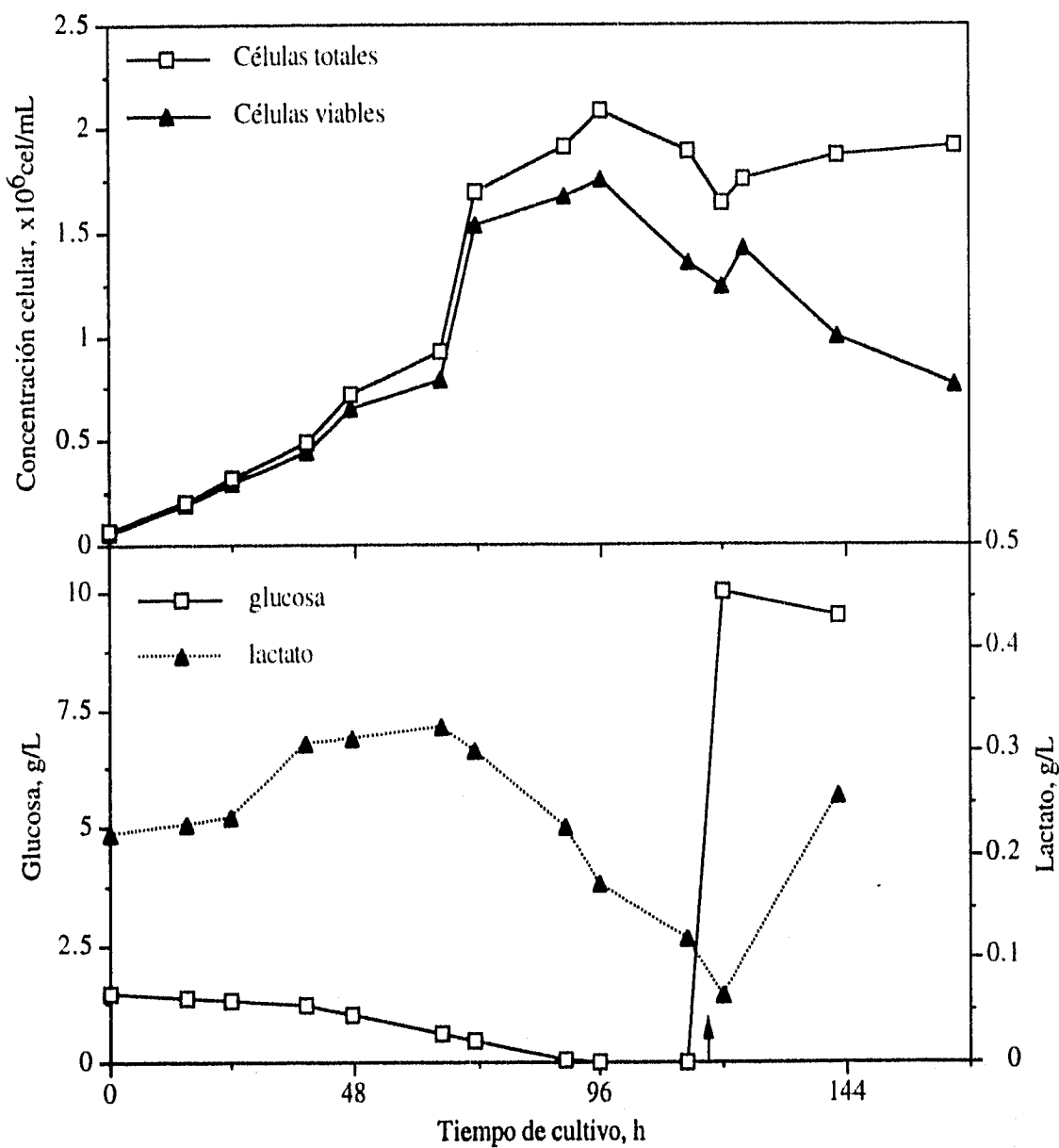


Figura AIII.2 Comparación entre cultivo en TNM-FH completo y cultivo en TNM-FH sin glucosa con 0.5g/L de lactato



**Figura AIII.3 Cultivo en frascos agitados con 2X de concentración de glucosa.** La flecha indica el momento en el que se alimentó glucosa a una concentración final de 10 g/L.

Un cultivo posterior se inició con 1.4 g/L de glucosa, en lugar de 0.7 g/L que es la concentración en la formulación original. En la **Figura AIII.3** se muestra la cinética de crecimiento de este cultivo. La máxima velocidad específica de crecimiento en este cultivo fue de 0.035 h<sup>-1</sup>, mientras que para los cultivos en frascos agitados el promedio es de 0.024 h<sup>-1</sup>. Esto

indica que la concentración de 0.7 g/L presente en el medio es limitante para el crecimiento celular. La concentración máxima de células viables fue de  $1.75 \times 10^6$  cel/mL, muy similar a la obtenida para cultivos control de  $1.53 \times 10^6$  cel/mL. Esto confirma la existencia de otro componente, además de la glucosa, que limita el crecimiento celular. Cuando el cultivo se encontraba en el inicio de la fase de muerte fue alimentado con glucosa a una concentración de 10g/L. Esta concentración es la que tiene el medio Sf-900, en el que se han logrado propagar células de insecto hasta  $10 \times 10^6$  cel/mL<sup>4</sup>. La alimentación provocó un ligero crecimiento, de  $0.76 \times 10^6$  cel v/ mL a  $0.81 \times 10^6$  cel v/mL, aunque posteriormente las células continuaron en fase de muerte a pesar de la alta concentración de glucosa presente en el medio de cultivo. Esto señala la necesidad de alimentar otros nutrimentos, además de la glucosa, de forma racional para obtener la mayor concentración celular posible con una viabilidad alta.

Apéndice IV

**Cultivos en biorreactor instrumentado**

Tabla AIV.1 Coeficientes metabólicos y rendimientos a diferentes tensiones de oxígeno

OD, %	Parámetro	Glucosa	Carbono	Lactato	Gln	Cys	Met	Ala	Glu
30	Yap	2.02±0.04	58.5±6	NA	0.4 ±0.02	13.8±1	8.28±2	-1.11±0.3	-1.35±0.5
	qi	0.012±0.005	0.44±0.06	NA	0.02±0.02	0	0	-0.03	-0.02 ±0.0
10	Yap	2 ±0.4	28.48	NA	0.44	11.4	2.41	-1.31	-0.72
	qi	0.016±0.004	0.91	NA	0.06	0	0.01	-0.02	-0.04
5	Yap	1.82	22	-15.87	0.78	2.59	8.13	-1.34	-0.90
	qi	0.016	1.40	-0.492	0.04	0.01	0	-0.02	-0.03
2	Yap	1.69±0.02	60.06	-4.271	1.12	5.23	14.5	-0.56	-0.67
	qi	0.008	0.22	-0.004	0.13	0	0	-0.02	-0.02
0	Yap	0	0	0	0	0	0	0	0
	qi	0	0	0	0	0	0	0	0

Yap significa rendimiento aparente, qi significa coeficiente metabólico. Se muestra la diferencia entre los cultivos realizados por duplicado, excepto cuando la diferencia es igual a cero.

\* Rendimiento aparente de glucosa y lactato en  $\times 10^9$  cel/g, de carbono (lactato+glucosa+fructosa) en  $\times 10^6$  cel/mmol y de aminoácidos en  $\times 10^9$  cel/mmol.

\*\* Coeficientes metabólicos de glucosa y lactato en  $g/\times 10^9$  cel h, de carbono en  $\mu\text{mol}/10^6$  cel h, de aminoácidos en  $\text{mmol}/\times 10^9$  cel h.

Valores negativos se refieren a producción. NA significa "No se aplica". El rendimiento y coeficiente metabólico de glucosa se calcularon cuando no hubo consumo de fructosa o lactato. El rendimiento de carbono se calculó cuando la glucosa, la fructosa y el lactato eran utilizados simultáneamente por las células. En los cultivos donde hubo producción de lactato, se reporta también el coeficiente metabólico y el rendimiento. Para los cultivos realizados por duplicado (30, 10 y 2%) se reporta la media y el error. En el caso de los duplicados a 2 y 10% no se analizaron aminoácidos.

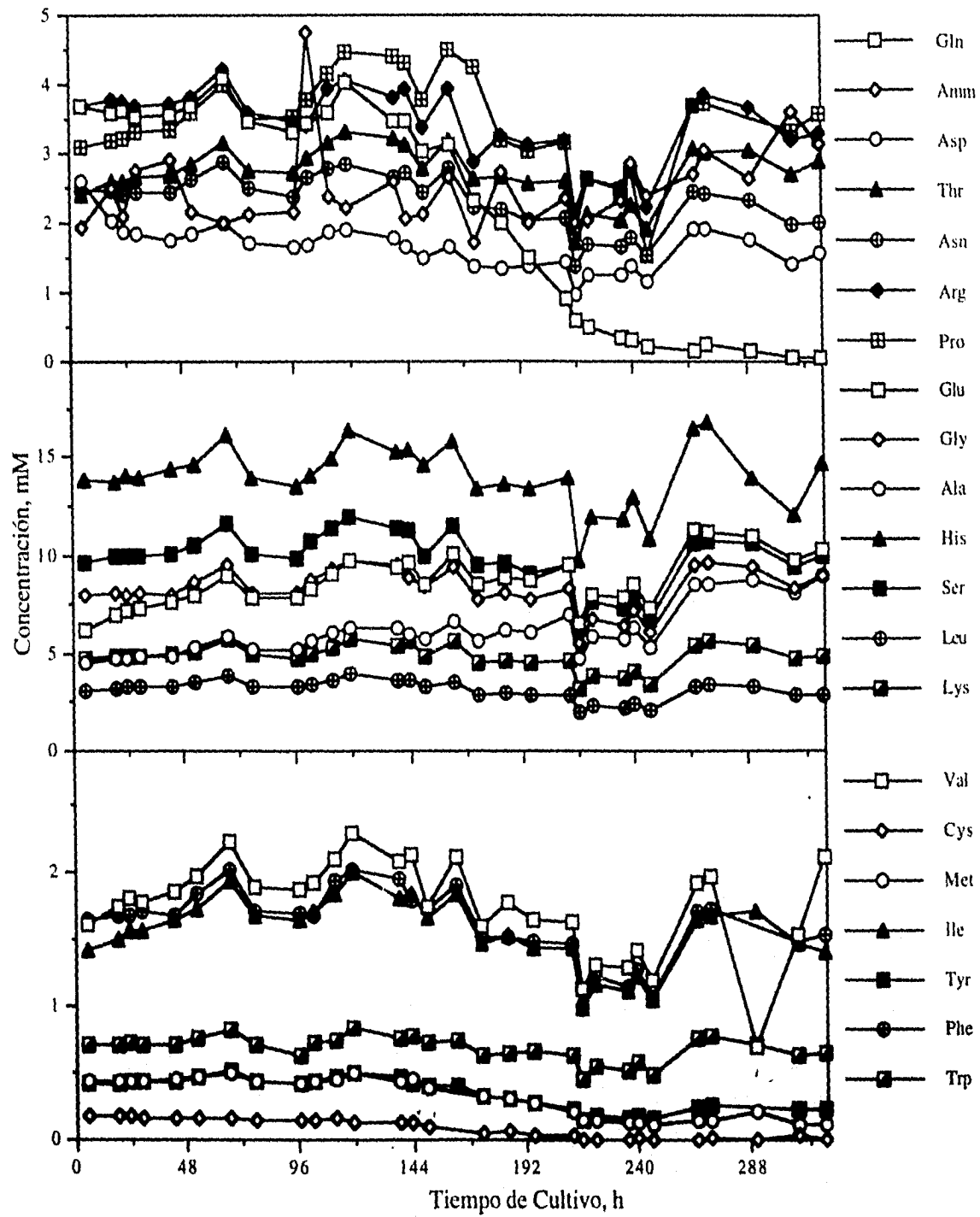


Figura AIV.1 Cinética de consumo/producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor 30% OD



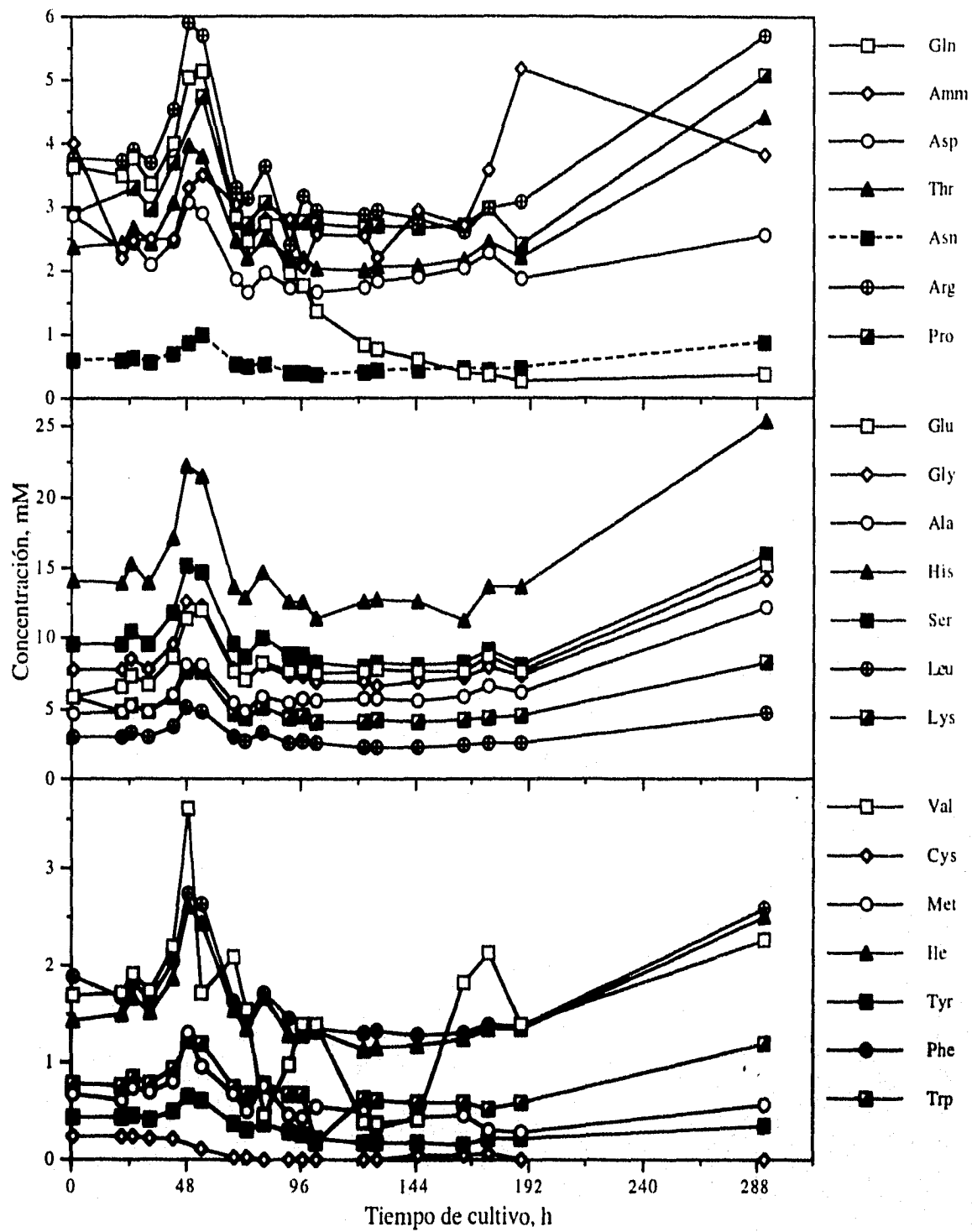


Figura AIV.2 Cinética de consumo y producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor 10% OD

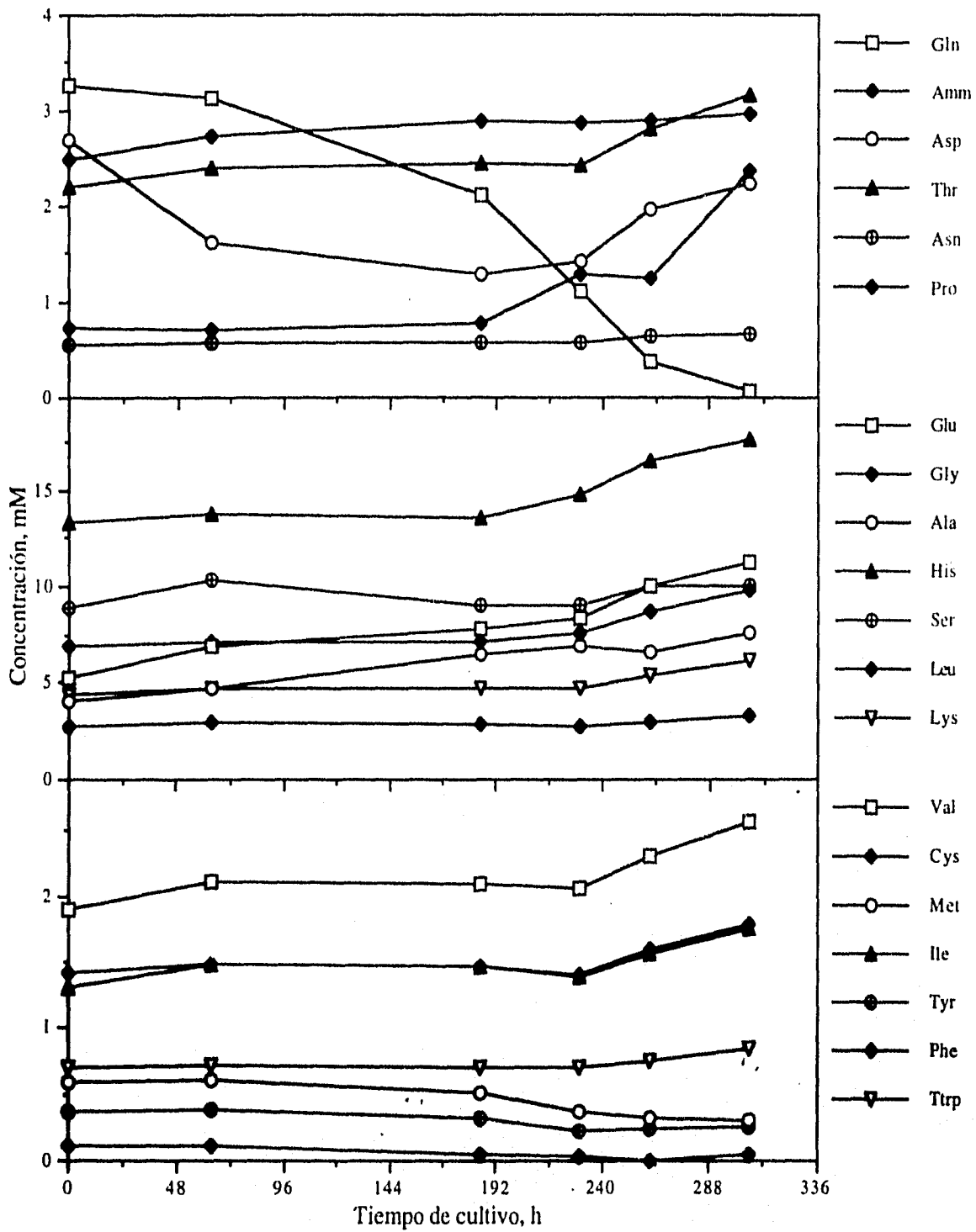


Figura AIV.3 Cinética de consumo/producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor a 5% OD

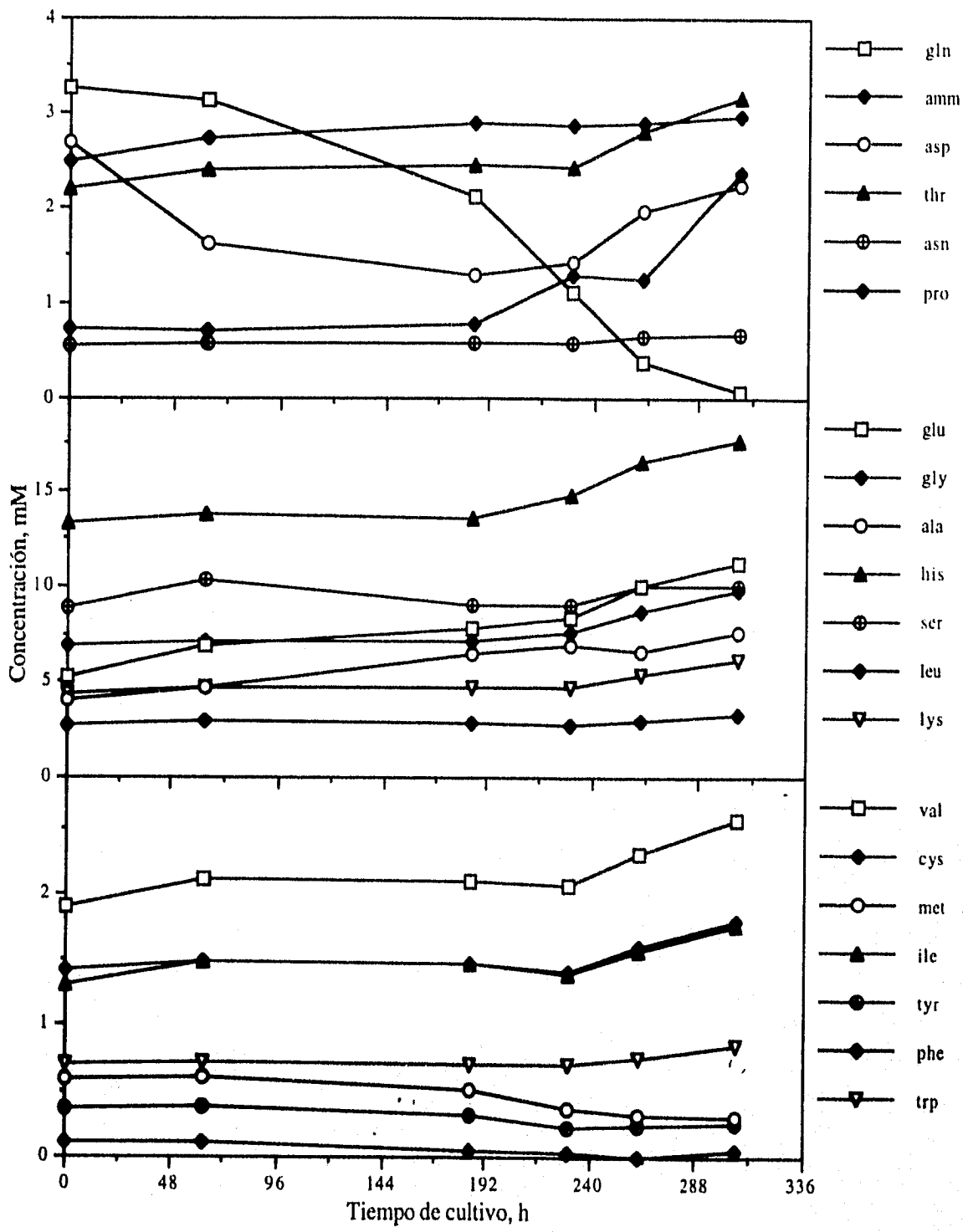


Figura AIV.4 Cinética de consumo/producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor a 2% OD

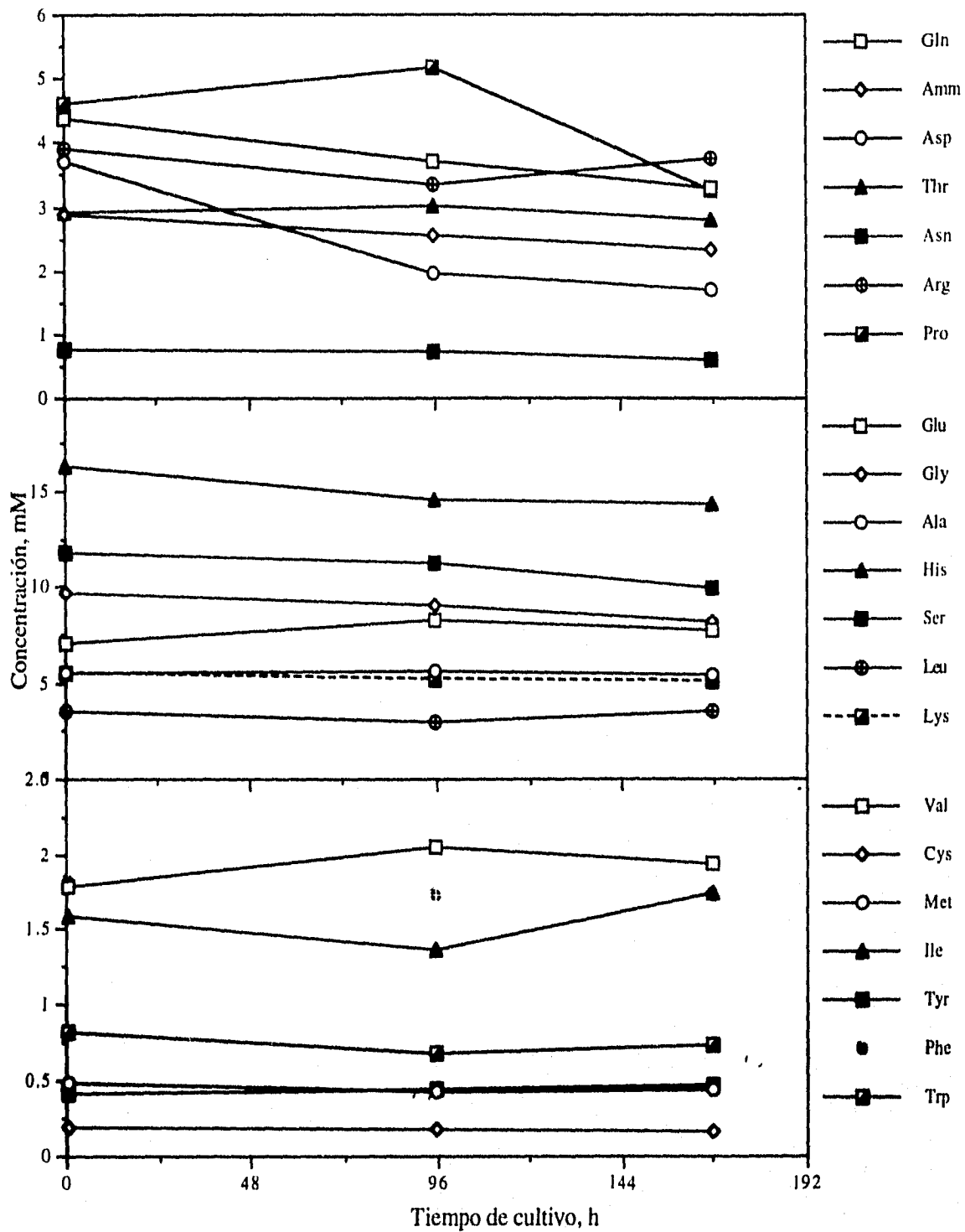


Figura AIV.5 Cinética de consumo/producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor a 0% OD

## AIV.1 Cultivo alimentado

**Tabla AIV.2 Rendimiento aparente y coeficiente metabólico de los nutrimentos clave en cultivo en lote alimentado caso 1**

	Glucosa	Carbono	Gln	Cys	Met	Glu	Ala
<b>Yap*</b>	1.98	52.47	13.9	14.99	10.204	-0.789	-0.831
<b>qi**</b>	0.0131	0.5	0.002	0.0017	0.098	-0.033	-0.031

Yap significa rendimiento aparente, qi significa coeficiente metabólico.

\* Rendimiento aparente de glucosa en  $\times 10^9$  cel/g, de carbono en  $\times 10^6$  cel/mmol y de aminoácidos en  $\times 10^9$  cel/mmol.

\*\* Coeficientes metabólicos de glucosa en  $\text{g}/\times 10^9$  cel h, de carbono en  $\mu\text{mol}/\times 10^6$  cel h y de aminoácidos en  $\text{mmol}/\times 10^9$  cel h

Se reportan los rendimientos aparentes y los coeficientes metabólicos de los nutrimentos clave antes de la primera alimentación. En este caso el rendimiento de carbono se refiere solo a los carbonos de la glucosa y el lactato, ya que no hubo consumo de fructosa en esta fase del cultivo.

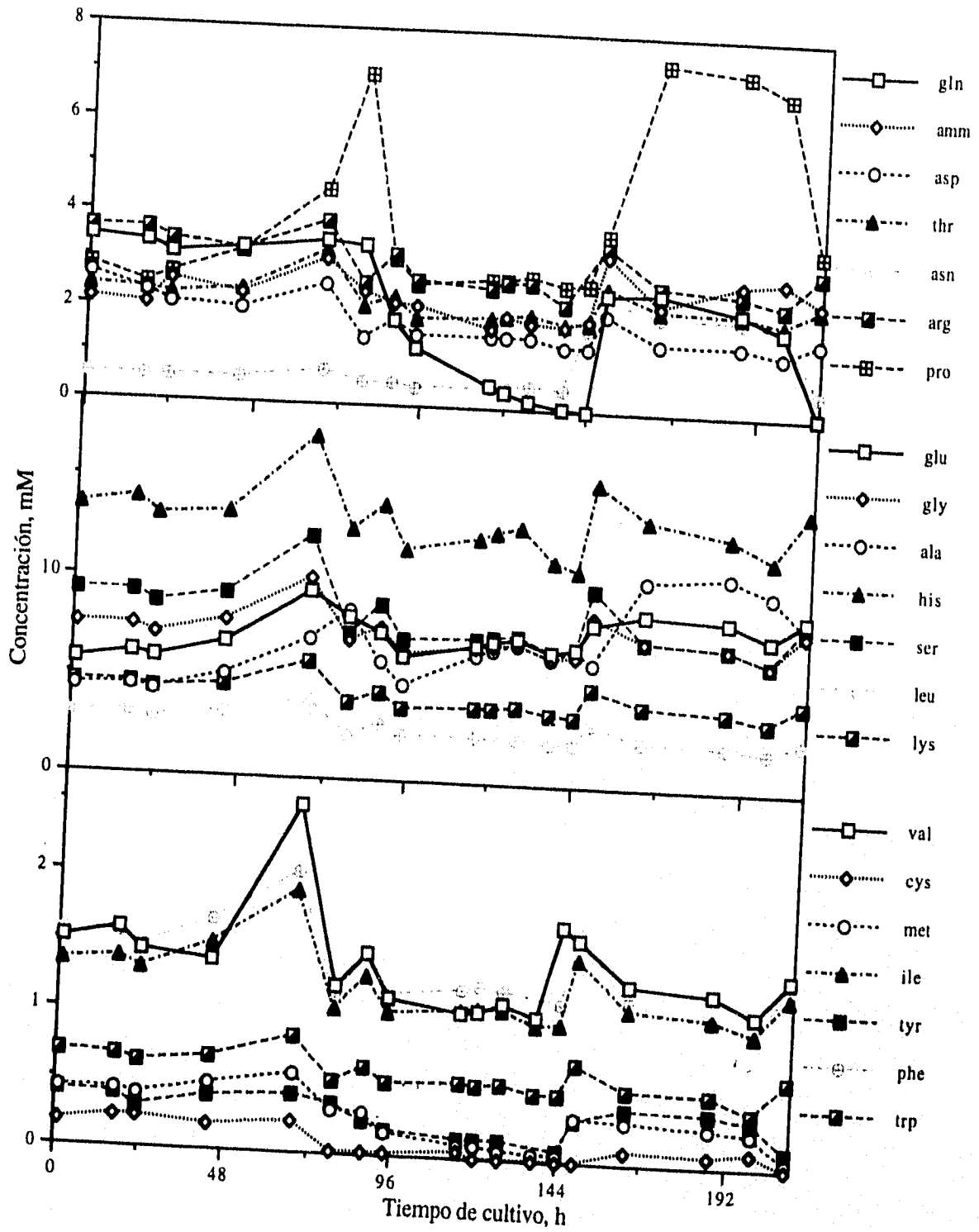


Figura AIV.6 Cinética de consumo/producción de aminoácidos en cultivo en biorreactor alimentado I