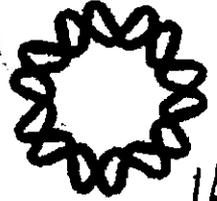


03072



Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma
de México



14

2 ej.

**"Evaluación de los sistemas enzimáticos glutamino
sintetasa y glutamato deshidrogenasa para la
eliminación de amonio del medio de cultivo de
células de eucariotes superiores"**

T E S I S

que para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

presenta

Ing. Francisco Villaseñor Ortega

Cuernavaca, Morelos

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

262784



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de 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) con la beca 91901.

A Dios.

Por permitirme asistir y concluir esta meta.

A mis Padres.

Parmen Ortega de Villaseñor.

y

Miguel Villaseñor Tirado.

*Quiénes con su cariño, esfuerzo, trabajo y sacrificio
lograron sacar adelante una familia tan grande.*

A mis Hermanos.

*Miguel, Salvador, José Luis, Parmen, Pelia,
Marcos, Guadalupe, Martha, Guillermina,
Salvador, Luz María, Leticia y Martín.*

*Quiénes con su apoyo incondicional y ejemplo, me
han motivado para lograr mis metas.*

A mis Sobrinos.

*Miguel Antonio, Luis Alberto, Osvaldo, Ivan,
José Rafael, Rafael, Martha Alejandra,
Guadalupe, Andrea, Marcos, Gerardo, Miguel,
Jessica, Arturo, Ricardo, Ernesto, Enrique,
Salvador y Martín.*

Reconocimientos:

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich por aceptarme en su grupo de trabajo, y por su apoyo para la realización de esta tesis.

A los miembros del Jurado, por sus valiosos comentarios en la revisión de este trabajo:

Dr. O. Tonatiuh Ramírez
Dr. Eduardo Bárzana
Dr. Agustín López Munguía
Dra Eida Guadalupe Espín
Dr. Rafael Vázquez

Al Instituto Tecnológico de Celaya, por todo el apoyo recibido.

Al M.B Alfonso Gómez por su participación en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos: Antonio, Edith, Angélica, Claudia, José Luis, José Antonio, Laura, Ronaldo, Ana Edith, Verónica, Miranda, Laura Idalia, Betty, Lolis, Martha, Gaby, Rocío, Rubén, Mónica, Patricia, Leticia, Nancy, Celiá, Gabriel y Mauricio.

A mis compañeros de laboratorio OTR/EG.

A mis compañeros de trabajo y amigos: Simeón Bautista, Hugo Jiménez, Lorenzo Guevara, Guadalupe Almanza, Humberto Ociel, Víctor Barrera, Leticia Márquez, Rafael Veloz, David Hernández, Luis David Patiño, Luis Guzmán, Paulina Barba, Ramón Guevara, Sanjuana Hernández, Teresa Sánchez, Ruth Trejo, María Reyna Rivera, Mayolo Juárez, Margarita Trejo, Luz María Rodríguez.

Indice general

	Página
Indice de figuras.	iv
Indice de tablas.	vi
Resumen.	1
Capítulo I	
1. Introducción.	3
Capítulo II	
2. Antecedentes.	5
2.1 Metabolismo de glutamina en células animales cultivadas <i>in vitro</i> .	5
2.1.1 Relación metabólica glucosa-glutamina.	7
2.2 Descomposición química de glutamina.	7
2.3 Toxicidad del ion amonio.	8
2.3.1 Trastorno en el transporte de iones sodio y potasio a través de la membrana citoplasmática.	9
2.3.2 Toxicidad por cambio del pH intracelular.	10
2.3.2.1 Toxicidad del NH_3 .	10
2.3.2.2 Toxicidad del NH_4^+ .	10
2.3.3 Efecto inhibitorio del crecimiento celular por aumento en la concentración de las reservas de aminoazúcares causado por amonio.	11
2.3.4 Efecto tóxico del amonio en el metabolismo celular.	12
2.4 Estrategias para contender con el problema de la toxicidad del amonio.	14
2.4.1 Estrategias para reducir la formación de amonio.	14
2.4.1.1 Reemplazo de glutamina por derivados estables.	14
2.4.1.2 Sustitución de glutamina por substratos alternativos estables.	15
2.4.1.2.1 Sustitución de glutamina por glutamato.	16
2.4.1.2.2 Sustitución de glutamina por asparagina.	17
2.4.1.3 Control de nutrientes: adición controlada de glutamina y glucosa.	17
2.4.1.3.1 Procesos alimentados con control predeterminado.	18
2.4.1.3.2 Procesos alimentados con control retroalimentado.	19
2.4.1.4 Selección y adaptación de líneas celulares.	20
2.4.1.5 ADN recombinante.	21
2.4.2 Estrategias para eliminar amonio.	23
2.4.2.1 Cultivos continuos con retención celular (perusión).	23
2.4.2.2 Adsorción mediante resinas de intercambio iónico y zeolita.	24
2.4.2.3 Membranas no porosas de intercambio iónico.	25

2.4.2.4	Membranas hidrofóbicas permeables a gas.	26
2.4.2.5	Eliminación de amonio por diálisis.	27
2.4.2.5.1	Electrodiálisis.	28
2.5	Enzimas con capacidad de eliminar amonio.	29
2.5.1	Glutamino sintetasa.	30
2.5.1.1	Aplicaciones biotecnológicas de la glutamino sintetasa.	31
2.5.2	Glutamato deshidrogenasa.	32
2.5.2.1	Aplicaciones biotecnológicas de la glutamato deshidrogenasa.	33
Capítulo III		
3.	Objetivos.	34
3.1	Objetivo general.	34
3.2	Objetivos específicos.	34
Capítulo IV		
4.	Materiales y métodos.	35
4.1	Líneas celulares.	35
4.2	Medios de cultivo.	35
4.3	Congelación de células.	36
4.4	Inóculo.	36
4.5	Cultivos estáticos por lote.	37
4.6	Cultivos en frasco agitado.	37
4.7	Métodos analíticos.	37
4.7.1	Determinación de la concentración celular.	37
4.7.2	Determinación de glutamato y glutamina.	38
4.7.3	Determinación de amonio.	38
4.7.4	Determinación de ortofosfato.	39
4.7.5	Determinación de la actividad enzimática de la glutamino sintetasa.	40
4.7.5.1	Ensayo de gamma transferasa (γ GT).	41
4.7.5.2	Ensayo de sintetasa.	42
4.7.6	Determinación de osmolaridad.	43
Capítulo V		
5.	Resultados y discusión.	44
5.1	Establecimiento de las condiciones de operación de la glutamino sintetasa.	44
5.2	Inactivación de la enzima GS.	47
5.3	Cinéticas de la glutamino sintetasa en medio de cultivo DMEM.	49
5.4	Cinética de la glutamato deshidrogenasa en medio de cultivo DMEM.	51
5.5	Estabilidad del ATP en medio de cultivo DMEM.	52
5.6	Estabilidad de la glutamina en medio DMEM.	54

5.7 Formulación de un medio de baja osmolaridad.	56
5.8 Efecto de la concentración del $MgCl_2$ sobre el crecimiento celular.	59
5.9 Efecto de la concentración del glutamato sobre el crecimiento celular.	61
5.10 Efecto de la concentración del ATP sobre el crecimiento celular.	61
5.11 Evaluación del efecto tóxico del ATP-Mg en relación al ATP.	63
5.12 Efecto de la concentración del ATP extracelular sobre el crecimiento en células de insecto <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf-9).	64
5.13 Efecto del α -cetoglutarato en cultivo de hibridomas.	65
5.14 Efecto de la presencia del NADH en el cultivo de hibridomas.	66
5.15 Efecto de la presencia del NADH extracelular en cultivo de células de insecto Sf-9.	67
5.16 Utilización del sistema enzimático GS con dosificación de ATP en pulsos.	68
5.17 Utilización del sistema enzimático GDH en cultivo de hibridomas.	70
Capítulo VI	
6. Conclusiones y direcciones futuras.	72
Bibliografía.	73

Índice de figuras

Figura 1.1	Diagrama del metabolismo de glutamina en hibridomas.	6
Figura 2.2	Diagrama esquemático del efecto tóxico del amonio generado tanto por las células como el producido por descomposición espontánea de glutamina.	13
Figura 5.1	Cinéticas de consumo de glutamato a diferentes concentraciones de enzima en buffer imidazol.	46
Figura 5.2	Efecto inhibitorio del EDTA en la reacción catalizada por la glutamino sintetasa al secuestrar los iones Mg^{2+} .	48
Figura 5.3	Comparación de las cinéticas de la enzima glutamino sintetasa en medio de cultivo DMEM para hibridomas con y sin SFB.	50
Figura 5.4	Cinética del proceso de eliminación de amonio con la enzima glutamato deshidrogenasa en medio de cultivo DMEM con SFB.	52
Figura 5.5	Cinéticas de generación de fosfatos por descomposición de 15 mM de ATP en medio de cultivo DMEM	53
Figura 5.6	Cinética de hidrólisis no enzimática de ATP, inferidas por la generación de ortofosfato.	54
Figura 5.7	Cinéticas de descomposición espontánea de glutamina en medio de cultivo DMEM.	55
Figura 5.8	Osmolaridad de diferentes medios formulados.	57
Figura 5.9	Incremento de osmolaridad por adición de los diferentes reactivos del sistema GS.	58
Figura 5.10	Cinética de crecimiento de hibridomas a diferentes concentraciones de $MgCl_2$.	60
Figura 5.11	Efecto de la concentración de $MgCl_2$ sobre la velocidad específica de crecimiento y tiempo lag en cultivos de hibridomas.	60
Figura 5.12	Efecto de la concentración de glutamato de sodio sobre la velocidad específica de crecimiento de hibridomas.	61
Figura 5.13	Cinéticas de crecimiento de hibridomas con dosificación de pulsos de ATP a diferentes concentraciones.	62
Figura 5.14	Cinéticas de crecimiento de hibridomas con dosificación de pulsos de ATP y ATP-Mg a diferentes concentraciones.	63
Figura 5.15	Efecto de la concentración del ATP y ATP-Mg sobre la velocidad específica de crecimiento de hibridomas.	64
Figura 5.16	Cinética de crecimiento de células de insecto con pulso de 5 mM de ATP.	65

Figura 5.17	Cinéticas de crecimiento de hibridomas con 2 mM de α -cetoglutarato inicial.	66
Figura 5.18	Cinéticas de crecimiento de hibridomas en presencia de 2 mM de NADH inicial.	67
Figura 5.19	Cinéticas de crecimiento de células de insecto Sf-9 en presencia de 5 mM de NADH inicial.	68
Figura 5.20	Cinéticas de crecimiento de hibridomas y producción de amonio, en presencia del sistema enzimático GS con dosificación de la concentración del ATP mediante pulsos.	69
Figura 5.21	Cinéticas de crecimiento de hibridomas en presencia del sistema enzimático GDH.	71

Indice de tablas

Tabla 2.1	Valores para el cálculo de la constante de primer orden de la descomposición química de glutamina en diferentes medios de cultivo a 37 °C como una función del pH.	8
Tabla 5.1	Comparación de la velocidad de reacción inicial de la enzima glutamino sintetasa en buffer imidazol a concentración de sustratos menor a saturación con la velocidad inicial teórica a condiciones de saturación de sustratos.	47
Tabla 5.2	Comparación de la actividad de la enzima glutamino sintetasa en buffer imidazol y medio de cultivo DMEM con y sin SFB.	49
Tabla 5.3	Efecto del incremento de osmolaridad del medio sobre velocidades específicas de crecimiento y metabólicas.	56
Tabla 5.4	Diferentes medios formulados con medio DMEM comercial y medio preparado con 15 mM de ATP, 6.25 mM de glutamato, 25 mM de MgCl ₂ y 1 unidad/ml de enzima.	57
Tabla 5.5	Comparación del incremento de osmolaridad real e ideal de cada uno de los componentes del sistema enzimático de la glutamino sintetasa.	58

RESUMEN

En los últimos años, el cultivo de células de eucariotes superiores (CES) ha adquirido gran importancia, debido a la exquisita actividad biológica de los productos generados por estas células. Entre estos productos se encuentran los anticuerpos monoclonales, vacunas, hormonas y factores de crecimiento, entre otros, cuya actividad en buena medida depende de las modificaciones post-traduccionales que son llevadas a cabo solamente por las células de eucariotes superiores. Sin embargo, la mayoría de los cultivos *in vitro* de CES se ven afectados cuando metabolitos tóxicos, como el amonio, alcanzan concentraciones inhibitorias para el crecimiento celular. En particular, concentraciones tan bajas como 2-3 mM de amonio reducen considerablemente el crecimiento de varias líneas celulares.

El amonio se genera por las células debido al metabolismo de aminoácidos y extracelularmente por la descomposición química de glutamina (Gln), así como la degradación enzimática de Gln por glutaminasas que generalmente están presentes en el suero. La Gln es un constituyente importante del medio de cultivo de células de mamíferos ya que es la principal fuente de nitrógeno y energía. La inhibición por amonio puede reflejarse en una disminución de la velocidad específica de crecimiento, un aumento de la velocidad específica de muerte y disminución de rendimientos.

Se han empleado algunas estrategias para reducir o eliminar la formación de amonio pero todas ellas presentan serias desventajas. Este trabajo presenta la utilización de dos métodos enzimáticos para la eliminación de amonio en medio de cultivo de CES, el de la glutamino sintetasa GS (EC 6.3.1.2) que además regenera Gln y el de la glutamato deshidrogenasa GDH (EC 1.4.1.3).

Se evaluó la estabilidad de la Gln y ATP en el medio DMEM a las condiciones de pH y temperatura del cultivo de hibridomas. La constante de primer orden de descomposición química de la glutamina en medio DMEM a pH 7.2 y 37 °C fue de 0.0016 h⁻¹ y para el ATP fue de 0.0011 h⁻¹.

Se determinó la cantidad de enzima y concentración de reactivos adecuada para utilizar el sistema enzimático GS en el medio de cultivo DMEM (Eagle modificado por Dulbecco) para eliminar el amonio. Se encontró que la cantidad adecuada de enzima y concentración de reactivos fueron de 1 unidad/ml, 25 mM de MgCl₂, 6.25 mM de glutamato de sodio y 15 mM de ATP.

Se utilizó el sistema enzimático GS para eliminar 5 mM de amonio previamente adicionado al medio de cultivo DMEM, sin suero fetal bovino (SFB) y formulado con 10%, los cuales

estuvieron libres de células. El sistema enzimático eliminó exitosamente el amonio previamente adicionado al medio de cultivo y se encontró que en medio con 10% de SFB la velocidad inicial de reacción se mantuvo constante por más tiempo comparado con el medio sin SFB. La velocidad de consumo de amonio inicial en medio con 10% de SFB fue de 0.0086 mM/min.

Se realizaron cultivos por lote de hibridomas BCF2 productores de anticuerpos monoclonales contra la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann, para estudiar el efecto de cada uno de los componentes del sistema GS sobre el crecimiento celular. Al aumentar la concentración del cloruro de magnesio en los cultivos por lote, disminuyó el tiempo de la fase lag en las cinéticas de crecimiento, de un valor de 23 hasta 0 h para una concentración de 15 mM. Además, se realizaron cultivos por lote con el sistema enzimático GS y con el ATP suplementado en pulsos de diferentes concentraciones durante la fase exponencial de crecimiento. El ATP extracelular resultó tóxico para las células de hibridoma a concentraciones de 0.1 mM. Se evaluó el efecto del ATP extracelular en un cultivo de células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf-9), el cual solamente presentó una ligera disminución en la concentración de células totales por la presencia de concentraciones de ATP de hasta 5 mM.

Asimismo, se utilizó el sistema enzimático de la GDH para eliminar 3.5 mM de amonio previamente adicionado en el medio de cultivo DMEM con 10% de SFB y libre de células. La concentración de enzima y de reactivos fue de 0.12 unidades/ml, 12.5 mM de α -cetoglutarato y 15 mM de NADH. La velocidad de consumo de amonio inicial fue de 0.0042 mM/min.

Se analizó individualmente el efecto de los componentes del sistema enzimático GDH en cultivo por lote de hibridomas. El α -cetoglutarato no afectó la viabilidad celular a concentración de 2 mM mientras que 2 mM de NADH resultó tóxico. Se realizaron cultivos por lote de hibridomas BCF2 en presencia del sistema enzimático GDH (1 unidad/ml de enzima, 2 mM de NADH y 2 mM de α -cetoglutarato). Además, se evaluó el efecto de la presencia de 5 mM de NADH adicionado al inicio del cultivo de células de insecto Sf-9. La presencia del NADH tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. Sin embargo, no produjo muerte celular, a diferencia de los cultivos de hibridomas donde la viabilidad disminuyó significativamente.

Los resultados del presente trabajo demuestran que los sistemas enzimáticos GS y GDH, pueden eliminar amonio del medio de cultivo de células de eucariotes superiores. Asimismo, tales sistemas tienen el potencial de utilizarse exitosamente en líneas celulares donde el ATP extracelular (para el caso del sistema GS) y NADH extracelular (para el sistema GDH) no resulten tóxicos.

CAPITULO I

INTRODUCCION

En la última década, los cultivos *in vitro* de células de eucariotes superiores, han adquirido una importancia e interés económico creciente para la producción de proteínas de alto valor agregado, como lo son los anticuerpos monoclonales (AcM), vacunas, hormonas, factores de crecimiento entre otros. Esto se debe, en gran medida, a que las CES realizan las modificaciones post-traduccionales típicas de células humanas, y que las células eucariotes inferiores y procariotes no pueden realizar. Tales modificaciones son indispensables para que las proteínas de uso terapéutico tengan la funcionalidad adecuada dentro del organismo.

Sin embargo, la mayoría de los cultivos *in vitro* de CES se ven afectados cuando productos tóxicos del metabolismo, como amonio y lactato, alcanzan concentraciones inhibitorias para el crecimiento. El lactato se genera principalmente por la oxidación incompleta de glucosa por la vía glicolítica. El piruvato, que es el producto final de esta vía, es transformado a lactato para mantener el estado de oxidación de la célula. La acción tóxica del lactato es probablemente debida al efecto sobre el pH y osmolaridad en el medio de cultivo y solo ocurre a concentraciones relativamente elevadas (20-30 mM). Su efecto inhibitorio se puede contrarrestar parcialmente mediante el control de pH.

La inhibición por amonio parece jugar un papel mucho más importante, pues a concentraciones tan bajas como 2-3 mM puede reducir considerablemente la velocidad de crecimiento, dependiendo de la línea celular. El amonio se genera por las células debido al metabolismo de aminoácidos y extracelularmente por la descomposición química espontánea de Gln en piroglutamato y amonio, así como la acción de glutaminasas presentes en el medio.

Muchas células normales producen Gln *in vivo*. Sin embargo, las células tumorales o normales con altas tasas de proliferación *in vitro*, muestran altas velocidades de consumo de Gln. Este aminoácido no es sólo un constituyente de las proteínas, sino que también se requiere para la síntesis de purinas y es el principal donador de grupos amino en la síntesis de pirimidinas, aminoazucars y asparagina. Existen fuertes evidencias que la Gln es la fuente energética más importante en cultivo *in vitro* de células tumorales y normales con potencial proliferativo, aún cuando la glucosa esté presente.

Existen varias hipótesis sobre el efecto tóxico del amonio, tales como un trastorno causado

por el amonio sobre el transporte de iones sodio y potasio a través de la membrana citoplasmática, cambios de pH citosólico y dentro de los organelos, aumento en la concentración de UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilgalactosamina disminuyendo las reservas de UTP.

Se han empleado algunas estrategias para reducir la generación de amonio, tales como: remplazo de Gln por derivados más estables como los dipéptidos de Gly-Gln y Ala-Gln; remplazo de Gln por glutamato; adición controlada de Gln; selección y adaptación de líneas celulares a medios libres de Gln; uso de técnicas de DNA recombinante para generar líneas independientes a Gln. También se han utilizado estrategias para eliminar el amonio ya formado, tales como: cultivos continuos con retención celular; uso de resinas de intercambio iónico o el uso de membranas de diálisis.

A pesar de que las estrategias anteriores reducen la producción de amonio o lo eliminan parcialmente, presentan serias desventajas. Por ejemplo, en el caso de los métodos para reducir la formación de amonio, como el remplazo de Gln por derivados, no todas las líneas celulares tienen la capacidad de utilizarlos. La adición controlada de Gln reduce pero no evita la formación de amonio y este puede aún alcanzar concentraciones inhibitorias. La selección o adaptación de líneas celulares a medios libres de Gln es tediosa, tardada e intensiva en manipulación y no es general, ya que muchas líneas celulares tienen un requerimiento absoluto por Gln. En el caso de las técnicas de DNA recombinante, no todos los promotores usados han dado resultados satisfactorios y no siempre se logra obtener líneas celulares transformadas.

Los métodos para eliminar el amonio ya formado también presentan limitaciones. Por ejemplo, en los cultivos continuos con retención celular, el medio de cultivo se utiliza de manera ineficiente, en particular el suero fetal bovino. Además, los dispositivos de retención celular se pueden obstruir limitando el tiempo de operación. La remoción de amonio utilizando resinas no es selectiva y puede remover otros cationes, principalmente potasio y sodio, asimismo se tienen que reconstituir una vez que se han saturado. En el proceso de diálisis, las membranas pueden presentar problemas de obstrucción por proteínas o por la adhesión de células.

En el presente trabajo se estudia la posibilidad de utilizar las enzimas glutamino sintetasa y la glutamato deshidrogenasa para la eliminación de amonio en cultivos de CES, como una alternativa novedosa. Estas enzimas presentan valores de pH y temperatura de reacción óptimos próximos a los valores en que se realizan la mayoría de los cultivos de CES (pH 7.1 y 37 °C para GS y pH 7.3 y 25 °C para GDH). El sistema GS tiene la ventaja adicional que regenera Gln, la cual es necesaria en la mayoría de los cultivos de CES.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 Metabolismo de glutamina en células animales cultivadas *in vitro*.

La principal fuente de carbono y energía en la mayoría de los medios de cultivo para células de eucariotes superiores deriva de glucosa y Gln, respectivamente; además, estos nutrimentos proporcionan precursores biosintéticos (Miller y Blanch, 1991).

Muchas células normales producen Gln *in vivo*, sin embargo, células tumorales o células que proliferan en cultivo exhiben altas velocidades de consumo de esta (Miller y Blanch, 1991). La Gln es el aminoácido que proporciona la mayor fuente de energía en las células de mamífero. Además se requiere para la síntesis de purinas y para la formación de nucleótidos de guanina (Miller y Blanch, 1991; Jeong y Wang, 1995). Es también el principal donador de grupos amino en la síntesis de pirimidinas, amino azúcares y asparagina. No obstante, algunas células pueden usar glutamato directamente y no requieren Gln (Miller y Blanch, 1991).

La mayoría del esqueleto carbonado de la Gln entra al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT) como α -cetoglutarato (Miller y Blanch, 1991). Hay tres vías en las cuales la Gln puede ser catabolizada. La primera es una completa oxidación a CO_2 a través del CAT, la segunda es una oxidación parcial a lactato y la última es otra oxidación parcial a aspartato o a alanina rindiendo 24-27, 6-9 y 9 mol de ATP por mol de Gln, respectivamente (Jeong y Wang, 1995). Otros productos principales incluyen, glutamato, citrato y macromoléculas (Miller y Blanch, 1991).

Las velocidades altas de consumo de Gln en cultivo de células pueden contribuir a elevar la producción de lactato, como es puesto en evidencia por el aumento en la producción de lactato glicolítico en células L929 después de la adición de Gln (Miller y Blanch, 1991).

Las cinéticas de crecimiento, consumo de Gln y generación de amonio en un cultivo por lote, son descritas por las ecuaciones 1, 2 y 3 respectivamente. (Ozturk y Palsson, 1990).

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v \quad (1)$$

específica de consumo de Gln, $p_{NH_4^+}$ es la velocidad específica de producción de amonio y k es la constante de descomposición espontánea de primer orden.

2.1.1 Relación metabólica glucosa-glutamina

La glicólisis y glutaminólisis (oxidación parcial de glutamina) están conjuntamente reguladas para proporcionar suficiente energía dependiendo de la disponibilidad de glucosa y Gln. La concentración de glucosa en el medio regula inversamente el metabolismo de Gln. Así, el aumento de concentración de glucosa reduce el consumo de Gln y la disminución de concentración de glucosa estimula el metabolismo de Gln (Jeong y Wang, 1995). Una alta concentración de Gln aumenta la velocidad específica de consumo de ésta; como consecuencia, la disminución de la concentración de Gln o el aumento en concentración de glucosa puede reducir la velocidad de consumo de Gln, lo cual resulta en una reducción en la producción de amonio y disminución del consumo de oxígeno.

La Gln influye el metabolismo celular, ya que puede causar un incremento en el flujo de carbón de glucosa a través del ciclo de las pentosas fosfato y reducir el flujo a través de la vía glicolítica en fibroblastos diploides humanos (Jeong y Wang, 1995). Duval y col. (1991) reportaron que el agotamiento de Gln induce un arresto casi inmediato de otras vías metabólicas, incluyendo el uso de otros aminoácidos.

2.2 Descomposición química de glutamina.

La Gln sufre una descomposición espontánea en el medio de cultivo con producción de amonio y piroglutamato (Ozturk y Palsson, 1990). Esta reacción de descomposición sigue una cinética de primer orden con respecto a Gln.

$$-\frac{d[Gln]}{dt} = k[Gln] \quad (4)$$

La constante k está influenciada por el pH del medio, fuerza iónica, temperatura y la composición del medio (Ozturk y Palsson, 1990). Se ha reportado que los iones fosfato y arsenato aceleran la velocidad de descomposición de Gln. Lin y Agrawal (1988) reportan que la presencia del suero tiene efecto sobre la descomposición de Gln, sin embargo Ozturk y Palsson (1990) establecen que la concentración de suero (libre de la enzima glutaminasa) no tiene influencia sobre la descomposición química de Gln.

La dependencia del pH sobre k puede representarse por la ecuación (5) y en la tabla 2.1 se muestran valores típicos de las constantes de dicha ecuación para distintos medios.

$$\ln k = a + b\text{pH} \quad (5)$$

Tabla 2.1.- Valores para el cálculo de la constante de primer orden de la descomposición química de glutamina en diferentes medios de cultivo a 37 °C como una función del pH. La constante de velocidad k está en h⁻¹ (Ozturk y Palsson, 1990).

medio	a	b
IMDM	-18.31 (±1.21)	1.685 (±0.095)
OPTI-MEM	-16.76 (±1.11)	1.458 (±0.065)
DMEM	-17.07 (±1.12)	1.478 (±0.073)
RPMI-1640	-13.85 (±1.19)	1.133 (±0.055)

En particular se ha demostrado que existe correlación entre el contenido de fosfato del medio y la constante de descomposición. Por ejemplo, de los medios de la tabla 2.1, el RPMI-1640 tiene la más alta concentración de fosfato y la más alta constante de descomposición. Aunque IMDM, OPTI-MEM y DMEM tienen la misma concentración de fosfatos, la diferencia en constantes de descomposición es estadísticamente significativa. Debido a que estos medios difieren en su osmolaridad, un incremento de ésta ocasiona una disminución en la constante de descomposición. Este comportamiento podría deberse al aumento en la fuerza iónica al aumentar la osmolaridad.

2.3 Toxicidad del ion amonio

La presencia del amonio en cultivos de células de mamíferos tiene un efecto inhibitorio que se ve reflejado en una disminución de la velocidad específica de crecimiento, aumento en la velocidad específica de muerte, disminución de rendimientos sobre sustrato, cambios en velocidades metabólicas, perturbación de procesamiento de proteínas y replicación de virus (Newland y col., 1994; Schneider y col., 1996). Existen varias hipótesis sobre el mecanismo de toxicidad del amonio (tanto como amoniaco NH₃ o ion amonio NH₄⁺) en cultivo *in vitro* de células de mamífero.

2.3.1 Trastorno en el transporte de iones sodio y potasio a través de la membrana citoplasmática.

Esta hipótesis establece que la toxicidad del ion amonio se debe a un aumento en la demanda de energía de mantenimiento, causada por la necesidad de preservar los gradientes de iones sobre la membrana citoplasmática (Martinelle y Häggström, 1993). La formación de NH_4^+ en las células ocurre principalmente en la mitocondria por las enzimas glutaminasa y glutamato deshidrogenasa. El NH_4^+ formado establece un equilibrio con NH_3 , el cual depende del pH ($\text{pK}=9.27$ a 37°C) de acuerdo a la ecuación (6).

$$\text{pH} = \text{pK} + \log(\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+) \quad (6)$$

El NH_3 se puede difundir fácilmente a través de las membranas celulares ya que no tiene carga. La difusión del NH_3 hacia el citoplasma ocasiona que el pH de la mitocondria disminuya. El NH_3 que se difunde al exterior de la célula puede ser transportado de regreso a través de la membrana citoplasmática como NH_4^+ vía ciertas proteínas transportadoras tales como Na^+/K^+ ATPasa y el cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$, debido a que el NH_4^+ hidratado tiene el mismo radio iónico que el K^+ hidratado (esto ocasiona una disminución en la concentración de K^+ que es importante para muchas enzimas y para mantener los gradientes de potasio sobre las membrana citoplasmática). Lo anterior causa un ciclo inútil, con un costo de energía: A) a expensas directa de ATP, si el amonio entra directamente vía la Na^+/K^+ ATPasa; B) e indirectamente si este entra vía la proteína cotransportadora $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$. En este último caso el ion sodio transportado tiene que ser nuevamente bombeado fuera de la célula para mantener el gradiente de sodio sobre la membrana. Esto es realizado por la Na^+/K^+ ATPasa, un proceso que a su vez puede acelerar el proceso de entrada de iones amonio. Además, para contrarrestar la carga ácida, la célula tiene que bombear fuera los protones. Esto es efectuado normalmente por el intercambiador Na^+/H^+ , un transportador el cual es activado cuando el pH citoplasmático cae abajo de 7. De nuevo se origina la necesidad de bombear sodio hacia afuera por la Na^+/K^+ ATPasa.

La formación de NH_4^+ en la mitocondria de las células ocasiona una disminución en el pH tanto de la mitocondria como del citoplasma y alcaliniza el ambiente exterior. A su vez, el NH_4^+ adicionado al cultivo celular o el generado por la descomposición espontánea de Gln ocasiona que disminuya el pH citoplasmático, que se incremente el pH de la mitocondria y que se alcalinice el ambiente exterior. Consecuentemente, la diferencia entre la adición y

formación de NH_4^+ radica en el cambio del valor de pH mitocondrial. Otros compartimentos celulares se tornarán alcalinos al difundirse el NH_3 dentro de ellos.

2.3.2 Toxicidad por cambios del pH intracelular.

2.3.2.1 Toxicidad del NH_3 .

Otra hipótesis establece que el efecto tóxico se debe al NH_3 , el cual es una molécula pequeña, no cargada que se difunde a través de las membranas celulares (Schneider y col., 1996). A valores de pH fisiológico de 7.1-7.5, que son también los valores de pH a los que se efectúan la mayoría de cultivos de células de mamíferos, solo aproximadamente el 1% de la concentración de amoníaco y amonio está presente como NH_3 ; el resto es NH_4^+ . Sin embargo, este pequeño porcentaje de NH_3 presente en las fases acuosas intra y extracelular se difundirá a través de las membranas, equilibrando rápidamente cualquier gradiente de NH_3 a través de ellas.

Dado que la protonación es extremadamente rápida, el pH de equilibrio es reconstituido inmediatamente. En los compartimentos con un pH bajo, la presión parcial de NH_3 es baja, favoreciendo un flujo constante de entrada de NH_3 a través de la membrana de estos compartimentos, hasta alcanzar el equilibrio. Como consecuencia el pH aumenta, por lo que el amonio puede seriamente perturbar el funcionamiento de organelos con bajo pH interno, tal como los lisosomas (McQueen y Bailey, 1991). También ocurre un hinchamiento osmótico en los lisosomas por la acumulación de aminas. Se piensa que el incremento de pH intralisosomal (pH_{i1}) es la razón de la inhibición de receptores que median la endocitosis de macromoléculas.

2.3.2.2 Toxicidad del NH_4^+ .

El NH_4^+ es la especie responsable de la acidificación citoplasmática; existe una correlación entre el efecto del pH extracelular (pH_e) al agregar el amonio y su influencia sobre el pH intracelular (pH_i). Una disminución en el pH_e e incremento en la concentración de NH_4^+ extracelular causa acidificación citoplasmática así como inhibición del crecimiento (McQueen y Bailey, 1990). La disminución de el pH_i ocasiona una severa inhibición de algunas enzimas como las de la glicólisis.

Existen razones para sospechar que el pH_i puede ser un factor de control en la proliferación celular (McQueen y Bailey, 1991). Uno de los primeros eventos de respuesta en

células de fibroblastos humanos a factores de crecimiento es la estimulación del intercambiador Na^+/H^+ , conduciendo a una alcalinización citoplasmática de aproximadamente 0.2 unidades. Se ha encontrado que el crecimiento de tumores humanos, fibroblastos de pulmón de hámster chino y linfocitos del bazo de ratón son severamente dependientes de el pH_e , y esto ha reflejado el efecto de pH_e sobre pH_i . Mediciones *in vitro* de la dependencia del pH sobre enzimas celulares sugiere que pH_i puede ser un factor de control *in vivo*. La dependencia de la enzima fosfofructocinasa a cambios de pH mostró que 0.2 unidades de disminución fue suficiente para inactivarla.

McQueen y Bailey (1990) observaron que la adición de 3 mM de NH_4Cl en el cultivo tuvo un pequeño efecto sobre el crecimiento y el pH_i disminuyó en 0.1 unidades. Por el contrario, 10 mM de NH_4Cl causó una inhibición sustancial del crecimiento y una disminución de 0.2-0.3 unidades en el pH_i . Una disminución de 0.2 unidades en pH_i es suficiente para inhibir el crecimiento y conducir a la acumulación de células en fase G1 (Schneider y col., 1996). Los cambios en pH_e y en la concentración de NH_4Cl que causan inhibición del crecimiento no tienen efecto sobre la velocidad específica de producción de anticuerpos para células creciendo en biorreactor o en frasco agitado. Cuando el pH_e disminuye, el rendimiento celular sobre glucosa se incrementa. Se cree que esto se debe a la disminución del pH_i y su efecto sobre la actividad enzimática, especialmente sobre fosfofructocinasa. Un aumento en la concentración de NH_4Cl disminuye el pH_i y tanto el rendimiento celular sobre glucosa como el rendimiento celular sobre Gln disminuyen.

2.3.3 Efecto inhibitorio del crecimiento celular por aumento en la concentración de las reservas de aminoazúcares causado por amonio.

Las reservas intracelulares de UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GNAc) se elevan al final de la fase exponencial de crecimiento de hibridomas y células recombinantes BHK (Ryll y col., 1994). La concentración UDP-GNAc también se eleva rápidamente como una respuesta a la aplicación de NH_4Cl exógeno; esto se ve favorecido con un pH de cultivo elevado. Ryll y col. (1994) consideran que el compuesto inhibidor universal es UDP-GNAc.

Se ha observado que la glucosamina y galactosamina son inhibidores del crecimiento celular, especialmente en células tumorales. Se cree que el efecto inhibitorio del crecimiento celular producido por glucosamina es el resultado de la utilización de UTP en la formación de las reservas de UDP-GNAc, ocasionando una subsecuente deficiencia energética. Sin

embargo, Krug y col. (1984) reportaron que el efecto inhibitorio causado por glucosamina puede atribuirse a un aumento en la concentración de UDP-GNAc en lugar de una disminución de las reservas UTP y CTP.

La glucosa y el amonio son los precursores para la formación de las reservas de UDP-GNAc. A partir de la glucosa se obtiene fructosa 6 fosfato. La primer etapa bioquímica en la formación de UDP-GNAc es la transaminación de la fructosa 6 fosfato vía glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa, usando Gln como donador de grupos amino. Las células que crecen sin Gln también producen UDP-GNAc pero solo en pequeñas cantidades.

Existe una relación entre la sensibilidad de una línea celular a inhibición por amonio y la acumulación de UDP-GNAc intracelular. Por ejemplo las células BHK son más sensibles que los hibridomas y producen más UDP-GNAc a idénticas concentraciones de amonio. La UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilgalactosamina se sintetizan en el citoplasma de la célula y representan la forma activada de los correspondientes azúcares para las reacciones de glicosilación. Una alteración en su concentración, puede ocasionar una variación de los patrones de glicosilación de proteínas. Adicionalmente la D-glucosamina, que es un precursor de estos UDP azúcares, ha mostrado ser un inhibidor del proceso de glicosilación durante la multiplicación de virus.

2.3.4 Efecto tóxico del amonio en el metabolismo celular.

Esta hipótesis se basa en que el amoniaco ó el ion amonio pueden participar en reacciones enzimáticas y desplazar su equilibrio, o interactuar con enzimas de sitios regulatorios afectando el metabolismo (Schneider y col., 1996). El mecanismo de toxicidad intracelular del amonio puede ser parcialmente explicado por perturbaciones en el metabolismo energético a nivel de la mitocondria

Se ha sugerido que el amonio puede provocar un ciclo vano en las reacciones catalizadas por las enzimas glutaminasa y glutamino sintetasa. La glutaminasa cataliza la desaminación de glutamina, para rendir amonio y glutamato, mientras que la glutamino sintetasa cataliza la reacción inversa dependiente de ATP. Se cree que esto se debe a la activación de la glutaminasa por amoniaco, combinada con una deficiente regulación de la actividad de la glutamino sintetasa.

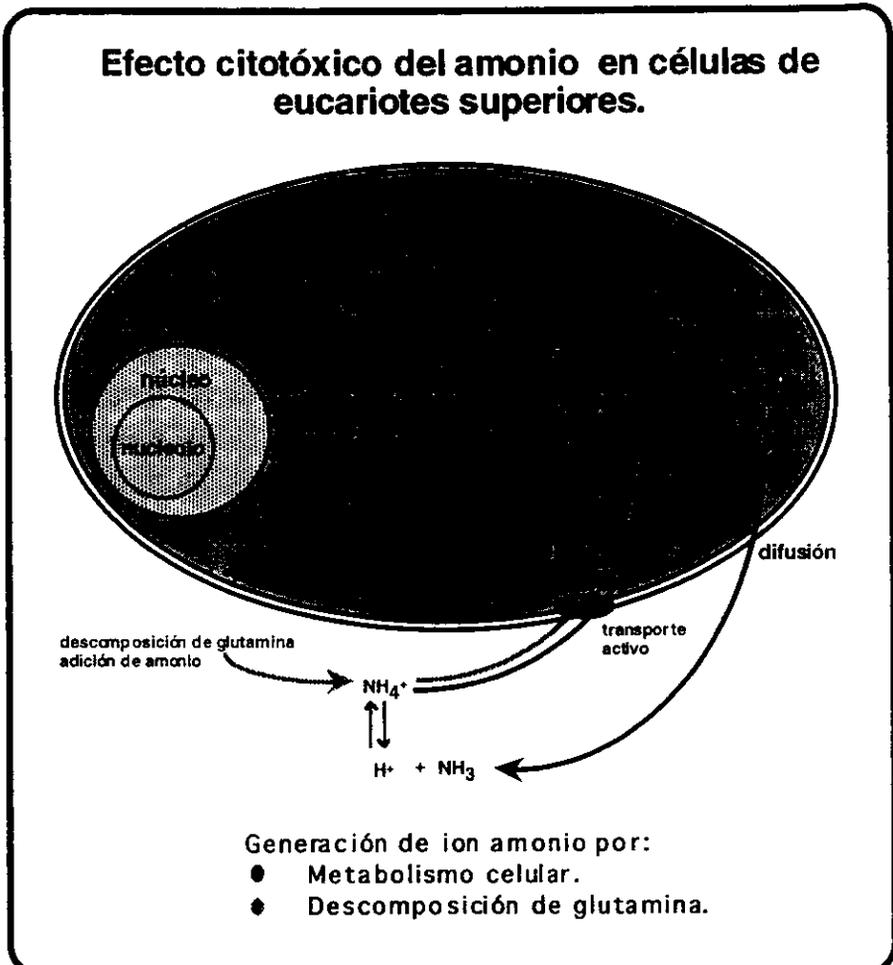
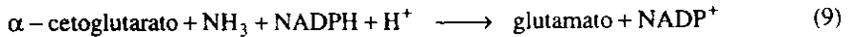
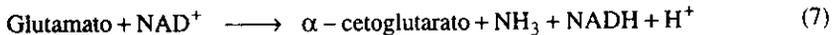


Figura 2.2 Diagrama esquemático del efecto tóxico del amonio generado tanto por las células como el producido por descomposición espontánea de glutamina. Modificado de Schneider y col. (1996)

La glutamato deshidrogenasa puede participar también en un ciclo vano. Esta enzima mitocondrial cataliza las reacciones de desaminación oxidativa de glutamato y la reacción inversa, la aminación reductora de α -cetoglutarato. La acumulación de amonio conduce a un estado más oxidado de dinucleótidos de nicotinamida mitocondriales, puesto que la reacción con glutamato requiere NAD^+ mientras que la de α -cetoglutarato y amoniaco requiere NADPH .



La suma de estas reacciones indica una pérdida de energía en forma de hidrólisis de ATP.

Las reacciones de transaminación, tales como la transferencia de grupos α -amino del glutamato al piruvato y α -cetoglutarato para rendir alanina y glutamato respectivamente, pueden jugar un papel en la destoxificación de amonio. Se ha reportado que el amonio liberado por las células es reducido a alanina. (Miller y col., 1988; Ozturk y col., 1992). Por lo tanto, el amonio puede reducir la eficiencia metabólica por forzar la excreción de intermediarios metabólicos para alcanzar la destoxificación. Un incremento en las velocidades de producción de alanina y consumo de Gln a elevadas concentraciones de amonio extracelular ha sido reportado por algunos autores. El uso excesivo de transaminaciones para destoxificar amonio puede conducir a una disminución de intermediarios del ciclo del ácido cítrico, incluyendo la disminución de α -cetoglutarato (Lanks and Li, 1988; Miller, 1989).

2.4 Estrategias para contender con el problema de la toxicidad del amonio.

2.4.1 Estrategias para reducir la formación de amonio.

Las estrategias para reducir la formación de amonio en los cultivos de células de mamífero, están enfocadas en la descomposición química de Gln en el medio de cultivo y en la producción de amonio por las células debido al metabolismo de aminoácidos, principalmente Gln.

2.4.1.1 Reemplazo de glutamina por derivados estables.

La descomposición química de Gln en el medio de cultivo puede evitarse reemplazándola por derivados estables. El grupo α -amino de la Gln será menos reactivo si se encuentra químicamente unido, evitando así la reacción de descomposición (Schneider y col., 1996). Para este fin se han utilizado dipéptidos tales como Gly-Gln y Ala-Gln (Butler y Andrew,

1994). La acumulación de amonio en los cultivos que utilizan dipéptidos es menor y pueden mejorarse los rendimientos celulares. Además, se tiene la ventaja que permite la esterilización del medio por calor e incrementa el tiempo de vida del mismo. Sin embargo, las células deben ser capaces de poder tomar estos derivados rápidamente y metabolizarlos. El aumento de la fase lag en los cultivos con dipéptidos se atribuye al periodo de liberación extracelular de una peptidasa y la subsecuentes hidrólisis de los dipéptidos. Esto permite un incremento gradual en la disponibilidad de Gln a las células. La ventaja de mantener una baja concentración de Gln es que la velocidad de acumulación de amonio es menor. Este efecto es sustancial en cultivos suplementados con Gly-Gln, los cuales mantienen una baja concentración de amonio y un rendimiento celular mayor hasta de 15% comparado con el control a base de Gln.

Butler y Andrew (1994) cultivaron hibridomas murinos CC9C10 en medio suplementado con Gln, Ala-Gln y Gly-Gln. Observaron que el dipéptido Gly-Gln debe adicionarse a una concentración de 20 mM comparado con 6 mM de Gln para obtener un crecimiento celular equivalente. En estos cultivos la máxima velocidad específica de hidrólisis de Gly-Gln fue aproximadamente 20% mayor que la de Ala-Gln, y el valor de Km es un orden de magnitud mayor para Gly-Gln. Esto indica una mayor afinidad de la enzima péptidasa para Ala-Gln y explica porque se requiere una alta concentración de Gly-Gln para obtener velocidades equivalentes de liberación de Gln.

Entre las líneas celulares que han podido crecer en ausencia de Gln pero con suplementación de dipéptidos, se encuentran células hematopoyéticas, timocitos e hibridomas murinos. El uso de dipéptidos de Gln puede resolver sólo parcialmente el problema de la toxicidad de amonio, ya que existen otras fuentes de formación de éste. Una desventaja del uso de dipéptidos que contienen Gln, es que éstos se deben adicionar en concentraciones relativamente altas debido a la baja afinidad de las peptidasas (Christie y Butler, 1994; Brand y col., 1987). Esto puede causar aumentos indeseables en la osmolaridad. Asimismo, de no existir un equilibrio entre la hidrólisis extracelular y el consumo de la Gln liberada, esta última se acumulará en el medio, con los correspondientes efectos negativos.

2.4.1.2 Sustitución de glutamina por sustratos alternativos estables.

La sustitución de Gln por glutamato y otros aminoácidos, evita el problema de la descomposición de Gln en el medio y reduce dramáticamente la formación de amonio por metabolismo celular (Schneider y col., 1996). El uso de un sustituto para Gln en medio de cultivo es una proposición atractiva por dos principales razones. Primero, por el potencial para

reducir la concentración de amonio acumulado durante crecimiento celular y segundo, para mejorar la estabilidad térmica del medio (Butler y Andrew, 1994).

2.4.1.2.1 Sustitución de glutamina por glutamato.

El glutamato es un candidato adecuado como sustituto de la Gln ya que tiene un grupo amino menos y es relativamente termoestable (Butler y Andrew, 1994). Sin embargo, las células requieren un periodo de adaptación durante el cual la actividad de glutamina sintetasa y la velocidad de transporte de glutamato se incrementan. En algunos cultivos suplementados con glutamato como sustituto de Gln, el rendimiento celular se incrementa y la acumulación de amonio disminuye. Sin embargo algunas líneas celulares no pueden adaptarse a crecer en medios con glutamato y esto puede ser debido a una baja eficiencia en el sistema de transporte para este aminoácido. Es posible que la glutamino sintetasa requerida para transformar el glutamato a Gln, puede ser defectuosa en células de hibridoma (Capiaumont y col., 1995). Hosoi y col. (1988) mostraron que fue necesario un periodo de adaptación de 8 meses para obtener una velocidad de crecimiento normal para células cultivadas en medio con glutamato.

Las líneas celulares varían en su capacidad de adaptación. Por ejemplo, McDermott y Butler (1993) compararon la adaptación de las líneas celulares MDCK y McCoy a medio con glutamato. Las células McCoy se adaptaron y alcanzaron una velocidad de crecimiento normal, mientras las células MDCK cesaron de crecer inmediatamente después de la transferencia a este medio. La disminución de Gln condujo a un aumento en actividad de la glutamino sintetasa en ambas líneas celulares. En cultivos libres de Gln, la actividad de la glutamino sintetasa es esencial para asegurar la formación de al menos la mínima cantidad de Gln intracelular requerida como un precursor para la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos. La adaptación de células McCoy fue asociada con un incremento en la capacidad para transportar glutamato del medio, mientras que para las células MDCK el transporte no se realizó a la velocidad suficiente para soportar la energía de metabolismo necesaria para el crecimiento.

Capiaumont y col. (1995) realizaron un remplazo parcial de Gln por glutamato en cultivos de hibridomas, lo cual disminuyó la producción de amonio, pero también disminuyó el crecimiento celular. Algunos autores han mostrado que la síntesis más eficiente de anticuerpo se obtiene en la fase estacionaria (Boraston y col., 1984; Velez y col., 1986), cuando solo una baja concentración de Gln está disponible y las células usan la energía para sintetizar anticuerpos en lugar de crecer. Esto resulta interesante para adaptar células de

hibridoma a crecer en medio conteniendo principalmente glutamato en lugar de Gln, aún pensando que no resultarían densidades celulares altas.

Bell y col. (1995) investigaron una línea de hibridomas murinos, la cual no pudo adaptarse a crecimiento en medio libre de Gln, aún en presencia de niveles elevados de glutamato. La capacidad de varias líneas celulares leucémicas humanas a crecer en ausencia de Gln fue comparada por Kitch y col. (1990) quienes encontraron que el crecimiento de líneas celulares B-linfoblastoides, incluyendo la línea celular promielocítica HL-60, es altamente dependiente de Gln. Por el contrario, las líneas de células T son capaces de proliferar en medios deficientes de Gln. El papel de la glutamino sintetasa fue propuesto como una base bioquímica para estas diferencias, ya que las líneas de células T Gln-independientes tienen una actividad significativamente alta de esta enzima, comparada con las líneas de células B Gln-dependientes.

Bols y col. (1995) reportaron el crecimiento de algunas líneas celulares de peces en medios libres de Gln. Las células de peces, en contraste a células de mamíferos, no requieren Gln.

2.4.1.2.2 Sustitución de glutamina por asparagina.

Kurano y col. (1990) sustituyeron glutamina por asparagina en cultivos de la línea celular CHO. El medio fue suplementado con suero, resultando en una concentración de Gln inicial proporcionada por el suero de 0.05 mM. Las células fueron capaces de crecer después de cuatro días de cultivo, a la misma densidad celular, sin embargo, solo fue observada una concentración 40% más baja de amonio en el medio libre de Gln en comparación a cultivos control.

2.4.1.3 Control de nutrientes: adición controlada de glutamina y glucosa.

Los cultivos alimentados representan una de las mejores alternativas para controlar la concentración de Gln en el medio con el fin de reducir la formación de amonio (Ramírez, 1996).

La concentración óptima de Gln deberá ser lo suficientemente baja para minimizar su descomposición espontánea y glutaminólisis, pero lo suficientemente alta para no limitar el crecimiento.

Un cultivo por lote alimentado limitado por Gln, puede reducir la producción de amonio pero incrementará la producción de lactato si las células son incapaces de obtener energía por la oxidación de la glucosa mediante el CAT. En este sistema una gran proporción de nitrógeno de Gln es incorporado en la biomasa (Ljunggren y Häggström, 1990). Por otra parte, un cultivo lote alimentado limitado en glucosa puede reducir la formación de lactado, pero al no obtener suficiente energía por la vía glicolítica puede compensar ésta por un aumento en el metabolismo de Gln ocasionando una alta producción de amonio (Kurokawa y col., 1994). Es muy interesante observar que la producción de anticuerpo se mejora por mantener un control simultáneo de glucosa y Gln a bajos niveles.

Las estrategias de alimentación en cultivo de hibridomas pueden aumentar la concentración y productividad de AcM por ejemplo hasta 17 y 6.5 veces respectivamente, comparados con los procesos por lote (Bibila y Robinson, 1995).

Los procesos alimentados se pueden clasificar en cultivos con control predeterminado y retroalimentado.

2.4.1.3.1 Procesos alimentados con control predeterminado.

Para la implementación de los procesos con control predeterminado se requiere un conocimiento previo y detallado del metabolismo y fisiología de cada línea celular en particular, ya que tanto la composición de los suplementos como el tiempo de adición se establecen a través de criterios empíricos. Este tipo de control generalmente resulta en una sobre o subalimentación de nutrimentos, con la respectiva acumulación de desechos tóxicos o limitación del crecimiento (Luan y col., 1987; Bushell y col., 1994; Duval y col., 1991).

Xie y Wang (1994) utilizaron una estrategia de alimentación para hibridomas cultivadas en frascos T utilizando una ecuación estequiométrica que describe el crecimiento. Además estudiaron la relación entre la demanda estequiométrica de Gln y aminoácidos no esenciales. La producción específica de amonio disminuyó 10 veces en comparación al cultivo por lote alimentado convencional y 50 veces comparada con el cultivo por lote. La densidad celular total y concentración de AcM aumentaron 5 y 10 veces respectivamente, en comparación con cultivos por lote convencionales.

Glacken y col. (1986) caracterizaron y describieron matemáticamente cinéticas de consumo de Gln y generación de amonio para células MDCK creciendo sobre

microacarreadores. De estas relaciones matemáticas formularon una estrategia de adición de Gln con la finalidad de mantener su concentración relativamente baja. La adición controlada de Gln se fue incrementando de acuerdo al crecimiento celular exponencial de tal manera que la concentración no fuera menor de 0.2 mM. Cuando sospecharon el agotamiento de Gln en el cultivo no controlado, suministraron una solución concentrada de este aminoácido para obtener una concentración de 4 mM. En el cultivo controlado se acumuló 66% menos de amonio en comparación al cultivo no controlado.

Ljunggren y Häggström (1990) realizaron un cultivo de mielomas murinos por lote alimentado de Gln. La velocidad de alimentación se calculó a partir de los datos de la velocidad específica de consumo de Gln en cultivo por lote. El cultivo por lote alimentado consumió menos Gln (2.5 contra 3.4 mM), produjo menos alanina (0.9 contra 1.3 mM) y la mitad de amonio (1.5 contra 2.9 mM) en comparación con el cultivo por lote ordinario.

2.4.1.3.2 Procesos alimentados con control retroalimentado.

En los procesos de control retroalimentado la concentración y tiempo de adición de los distintos nutrimentos se establece después de medir alguna variable de cultivo. Estos procesos tienen la ventaja de ser sencillos, confiables, de fácil implementación y evitan la sobre o subalimentación (Ramírez y Mutharasan, 1990; Higareda, 1994; Ramírez, 1990; Higareda y col., 1993).

Algunos sistemas utilizan la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) como variable de control, donde una repentina disminución del VCO puede atribuirse al agotamiento de Gln. Esto proporciona las bases para controlar la adición de Gln para reducir la formación de amonio. Higareda (1994) estableció estrategias de alimentación en cultivos de hibridomas a oxígeno disuelto (OD) constante. Utilizó la VCO como variable de control para la alimentación de Gln al momento del cese de la respiración celular. La adición repetida de Gln a concentraciones por debajo de 2 mM resultó en, por lo menos, un incremento del doble en la concentración celular máxima y 9 veces la concentración de AcM máxima comparado con cultivos por lote.

Recientemente se han reportado sistemas de flujo inyectado mediante los cuales se puede medir en línea alguno o varios componentes del medio de cultivo como por ejemplo glucosa, Gln y lactato (Graf y Schugerl, 1991; Kurokawa y col., 1994; Male y col., 1993; van der Pol y col., 1994). Sin embargo, estos sistemas son costosos, complicados y propensos a

contaminaciones. Además, el análisis de algunos componentes es tardado. Por lo anterior estos sistemas no siempre pueden incorporarse en algoritmos de control en línea y tiempo real.

Kurokawa y col. (1994) utilizaron un sistema de HPLC en línea para la medición de la concentración de glucosa, Gln y lactato en un cultivo de hibridomas. Mediante un algoritmo de control adaptativo controlaron la concentración de glucosa y Gln a 0.2 y 0.1 g/L respectivamente. Mediante esta estrategia lograron un aumento de aproximadamente el doble en la concentración celular y producción de anticuerpo, la concentración de lactato disminuyó de 46 a 15.7 mM y la de amonio de 4.1 a 3.2 mM.

Ljunggren y Häggström (1994) realizaron cultivo de hibridomas por lote alimentado limitado de glucosa y Gln (< 0.085 mM Gln y < 0.93 mM Glucosa). Este cultivo fue comparado con el cultivo por lote. En el cultivo por lote alimentado limitado de glucosa y Gln la eficiencia en metabolismo de energía se incrementó, ya que el coeficiente de rendimiento celular para glucosa aumentó 100 % y para Gln 150 %. Además, hubo una reducción en la producción de amonio y lactato por célula de 70 y 75% .

2.4.1.4 Selección y adaptación de líneas celulares.

Otra alternativa, aunque poco utilizada para contender el problema de la toxicidad del amonio, es la selección y adaptación de líneas celulares que no requieren Gln para su proliferación, ya que la acumulación de amonio se reduce significativamente en los cultivos sin Gln. El quimiostato proporciona un poderoso método para aplicar una presión selectiva continua al cultivo (Birch y col., 1994). Para seleccionar líneas celulares independientes a Gln mediante el cultivo en un quimiostato limitado de Gln y con suministro de glutamato en el medio alimentado, se iguala la tasa de dilución (D) a la velocidad de crecimiento de las células que requieren Gln. Cualquier subpoblación que pueda usar glutamato no se verá restringida por la velocidad de alimentación de Gln y será capaz de crecer a μ_{max} , al menos hasta el momento en el que el glutamato llegue a ser limitante.

Birch y col. (1994) mediante el uso de un quimiostato aislaron hibridomas con la capacidad de crecer en medios sin Gln, de una población que tenía un requerimiento absoluto para este aminoácido. Para aislar las variantes mantuvieron la concentración de Gln en la alimentación al nivel limitante de 97 mg/L e incluyeron en el medio 57 mg/L de glutamato de sodio. En el quimiostato se alcanzó un estado estable durante el cual la Gln esencialmente se

agotó, después de aproximadamente 55 días, la concentración de células viables aumentó y esto correspondió con la disminución en la concentración de glutamato residual en el reactor.

Viallard y col. (1986) lograron adaptar, a través de subcultivos sucesivos suplementados con glutamato, a células cancerosas de colon humano (HT29) para crecer en medios sin Gln.

Los procedimientos de selección y adaptación de líneas celulares al crecimiento sin Gln, presentan serias desventajas, ya que son tediosos, tardados e intensivos en manipulación y mano de obra. Aunque la acumulación de amonio se reduce, éste no se evita totalmente ya que se genera del consumo del resto de los aminoácidos (Birch y col., 1994). Además, tales procedimientos no son generales ya que existen muchas líneas celulares que tienen un requerimiento absoluto por Gln. Por ejemplo, Capiamont y col. (1995) no pudieron adaptar una línea de hibridomas a medios sin Gln.

Birch y col. (1994) realizaron intentos para aislar variantes tolerantes a amonio por cultivo de hibridomas en un quimiostato limitado de amonio. La alimentación contenía 100 mg/L, adicionados como cloruro de amonio. En la práctica no se establecieron estados estables y no hubo evidencia que las células tolerantes a amonio hubieran sido seleccionadas. Asimismo, se han realizado intentos para seleccionar a través de subcultivos sucesivos, líneas celulares tolerantes a amonio. Schumpp y col. (1992) fueron capaces de aislar líneas celulares de hibridoma, las cuales fueron resistentes al efecto tóxico del amonio y lactato por clonación de células en la presencia de altas concentraciones de estas sustancias.

2.4.1.5 ADN recombinante.

En años recientes se ha tenido un gran progreso en el desarrollo de sistemas de expresión genética y de procedimientos de ensayo para el aislamiento de células que producen altos niveles de proteínas (Birch y col., 1994). Actualmente ha aumentado el interés en el uso de técnicas de ADN recombinante para manipular la fisiología de las células con la finalidad de mejorar su metabolismo y características de crecimiento en procesos de producción. Recientemente estas técnicas también han sido utilizadas para contender con el problema de la toxicidad del amonio. Se ha correlacionado la actividad de la glutamino sintetasa con la capacidad que tienen ciertas células animales para poder crecer en medios libres de Gln (Bell y col., 1995). De esta forma se han podido generar líneas independientes de Gln, mediante la transfección con el gen de la GS (Birch y col., 1994; Bell y col., 1995). En estos casos, se ha

visto que los hibridomas presentan crecimientos específicos disminuidos, lo cual puede ser inclusive **bénéficio** ya que la producción específica de AcM puede aumentar bajo tales condiciones (Ramírez y Mutharasan, 1990; Birch y col., 1994).

Algunos autores han reportado la obtención de células transformadas; por ejemplo Bell y col. (1995) transformaron hibridomas murinos mediante electroporación con un vector conteniendo cDNA del gen de la glutamino sintetasa de células CHO bajo el control de el promotor temprano del citomegalovirus humano. La actividad específica de glutamino sintetasa en dos líneas celulares transformadas fue incrementada por 128 y 152 % respecto a las células no transformadas.

Birch y col. (1994) describieron la introducción del gen de la GS en un hibridoma murino secretor de IgM. Las transfectantes fueron identificadas por su capacidad a crecer en medio libre de glutamina. A su vez, Bebbington y col. (1992) realizaron la transfección de un hibridoma secretor de IgM con un vector conteniendo el gen de la GS. Las células crecieron en medio libre de suero y sin Gln, aunque la velocidad de crecimiento aumentó cuando el medio fue suplementado con 6 mM de Gln. Es interesante notar que la producción de anticuerpo fue más alta en los cultivos sin Gln. En la presencia de este aminoácido, la concentración máxima de AcM de la línea celular transfectada fue 1.7 veces más alta que la no transfectada.

Aunque la transfección del gen de la GS puede constituirse en una alternativa poderosa para disminuir la toxicidad de amonio, aún existen problemas e inconvenientes por superar. Por ejemplo, no todos los promotores usados han dado resultados satisfactorios con las distintas líneas celulares y no siempre se logra obtener colonias transformadas. Por ejemplo Bell y col. (1995) encontraron que transformantes del hibridoma murino PQXB1/2 con vectores conteniendo cDNA de la glutamino sintetasa de células CHO bajo el control de un promotor temprano SV40 no creció en medio de cultivo sin Gln. En la actualidad, los métodos de transfección son tardados, laboriosos y en ocasiones poco eficientes y reproducibles. Solamente en pocas líneas celulares se ha probado esta alternativa y los reportes sobre el tema son todavía muy escasos. Además, aún no es del todo claro si el mecanismo que confiere a las líneas celulares la capacidad de crecer sin Gln se debe efectivamente a las altas actividades de GS o a que poseen sistemas de transporte de glutamato más eficientes. Finalmente, al igual que en otras alternativas, no se evita la generación de amonio por otras vías distintas al metabolismo y descomposición de la Gln.

2.4.2 Estrategias para eliminar amonio.

2.4.2.1 Cultivos continuos con retención celular (Perfusión).

En el cultivo por perfusión con retención celular se alimenta medio fresco y se remueve medio semi-agotado en forma continua. De esta manera es posible realizar la eliminación no selectiva del amonio (Ramírez, 1996). En el caso de biorreactores agitados las células son retenidas mediante distintos dispositivos, tales como sedimentadores, filtros rotatorios, filtros externos, sistemas acústicos etc. En otros tipos de sistemas, como los biorreactores de fibras huecas y de camas empacadas las células son retenidas por el propio biorreactor (Ramírez y Mutharasan, 1987). En estos sistemas se han podido alcanzar altas concentraciones de células y productividades de AcM. Sin embargo, se debe tener precaución con estas cifras ya que en general estas se reportan por volumen de reactor y no por volumen de medio gastado, el cual puede ser de varios ordenes de magnitud superior al del biorreactor.

Nayve y col. (1994) realizaron cultivos por perfusión con hibridomas usando medio libre de suero y suplementado con cantidades adicionales de glucosa, glutamina, β -mercaptoetanol y factores de crecimiento. Observaron que la densidad celular viable máxima alcanzada y la concentración de anticuerpo no mejoraron con respecto al control. Además, el porcentaje de viabilidad celular disminuyó rápidamente ya que el amonio se acumuló hasta 10 mM, concentración a la cual fue inhibitorio, lo cual era de esperar ya que la concentración de Gln fue el doble. Cuando enriquecieron el medio solo con los factores de crecimiento, la concentración de células viables fue 1.25 veces mayor que el control y posteriormente disminuyó porque la concentración de amonio se incremento a un nivel inhibitorio; además la concentración de AcM al final del cultivo fue mas baja. Puede ser que adicionalmente a la inhibición por amonio, la baja concentración de Gln también limitó el crecimiento de las células y producción de AcM.

Además de los cultivos por perfusión anteriores, Nayve y col. (1994) acoplaron un sistema de remoción de amonio por adsorción en zeolita a un cultivo por perfusión utilizando medio enriquecido, la concentración de amonio fue mantenida abajo del nivel inhibitorio y se alcanzó una alta densidad celular viable de aproximadamente 2×10^7 células/ml. Este valor corresponde a un incremento de más de 300 % con respecto al del cultivo por perfusión convencional y es mejor comparado a cultivos suplementados con suero. La concentración de AcM es aproximadamente 10 veces mayor cuando se compara con cultivos por perfusión ordinarios y es casi la mitad del producido *in vivo*.

La desventaja de los cultivos en perfusión es que los dispositivos de retención celular, tales como la membrana de ultra filtración ó el filtro de cerámica se obstruyen o fallan fácilmente, complicando y limitando el tiempo de operación. (Ramírez, 1996). Además, el AcM puede adsorberse en el filtro de cerámica, lo cual se confirma al observar que su concentración disminuye cada vez que el filtro se cambia. Por otro lado, se hace uso ineficiente del medio de cultivo, en particular del suero fetal bovino, que es uno de los componentes más caros del medio, el cual no se agota totalmente en la corriente de salida. Además, en el caso de biorreactores heterogéneos, como por ejemplo, fibras huecas, microacarreadores y camas empacadas, se dificulta el control debido a la imposibilidad de medir directamente la concentración celular. Algunos sistemas son muy costosos, como por ejemplo los biorreactores de fibras huecas, en los cuales además se pueden presentar gradientes axiales y radiales, limitando su escalamiento y complicando su operación.

2.4.2.2 Adsorción mediante resinas de intercambio iónico y zeolita.

El método más simple para eliminar el amonio *in situ* del medio de cultivo de células es mediante su adsorción en zeolita ó en resinas de intercambio iónico. Sin embargo, se requiere de adsorbentes esterilizables por calor, no tóxicos y con alta capacidad de adsorción y selectividad para amonio.

Jeong y Wang (1992) analizaron varias resinas de intercambio iónico y la zeolita Phillipsite-Gismondine para su potencial aplicación como adsorbentes en la remoción *in situ* de iones amonio del medio de cultivo de células animales. Evaluaron la capacidad de adsorción de amonio y el efecto de la esterilización sobre su capacidad de adsorción. La zeolita mostró la mejor selectividad para amonio, así como la mejor capacidad de adsorberlo. Con base en estos resultados cultivaron hibridomas en frascos agitados en presencia de la zeolita, obteniendo un incremento de 15%, 28% y 16% en el número de células viables, viabilidad y concentración de AcM, respectivamente. La concentración final de amonio en el medio de cultivo con adsorbente fue la mitad comparada con el control.

Iio y col. (1984) utilizaron el intercambiador de iones silica-aluminium ZCP-50 en polvo dentro de un tubo de diálisis para la adsorción del amonio en cultivos de mielomas murinos. Utilizando este sistema, lograron incrementar la densidad celular al reducir la concentración de amonio.

Capiaumont y col. (1995) realizaron cultivos por lote de hibridomas con clinoptilolite (una piedra volcánica la cual tiene propiedades de intercambiador de cationes). Para esto colocaron el adsorbente en una columna empacada conectada al biorreactor y realizaron la destoxificación del cultivo. Mediante este sistema lograron mantener la concentración de amonio por abajo de 1 mM y pudieron reducir su concentración total más de 60 % e incrementar la densidad celular 40% en el cultivo destoxificado en comparación al control. Sin embargo, el uso de clinoptilolite requirió un constante rebalance iónico del medio para compensar el K^+ después de cada ciclo de destoxificación.

Nayve y col. (1994) realizaron un cultivo por perfusión de hibridomas en el cual utilizaron un modulo de filtro de cerámica para obtener medio de cultivo libre de células. Este filtrado lo dializaron y pasaron a través de una columna empacada de zeolita para remover el amonio. El sistema de remoción fue efectivo, la densidad de células viables se incrementó 300% y la producción de anticuerpo fue 10 veces más en comparación a experimentos control. Desafortunadamente, este sistema es muy complicado desde un punto de vista experimental.

Las resinas de intercambio iónico presentan la desventaja de que la remoción para amonio no es selectiva y puede remover otros cationes, principalmente potasio y sodio (Schneider y col., 1996). Aunque no existen reportes, probablemente también son removidos algunos componentes del suero, lo cual puede causar problemas. Además, las resinas tienen que ser reconstituidas después de ser saturadas, haciendo difícil su uso en procesos continuos.

2.4.2.3 Membranas no porosas de intercambio iónico.

Las membranas no porosas de intercambio iónico permiten el transporte del amonio a través de ellas, desde el medio de cultivo hacia el lado permeable, donde éste puede ser eliminado posteriormente mediante una solución de base, por vacío ó arrastre con gas inerte (Schneider y col., 1996).

Sikdar y col. (1994) Utilizaron una membrana no porosa de intercambio iónico para la eliminación de amonio. Investigaron la aplicación de varios procedimientos, entre ellos el uso de una solución de buffer fosfato a pH 7.2, ácido sulfúrico 0.025 M, pervaporación usando vacío y pervaporación usando arrastre con gas inerte. En este último la eliminación de amonio fue superior ya que el flujo de amonio a través de la membrana fue más alto cuando el pH de la solución del lado permeable se incrementó. Los autores concluyeron que el NH_3 fue la especie difundida.

En los procesos que utilizan membranas no porosas de intercambio iónico, se pueden originar problemas de eliminación no selectiva de otros cationes y la precipitación de carbonatos, principalmente de magnesio y calcio en el flujo aceptor alcalino. Esto conduce a una disminución de cationes esenciales, dando como resultado una reducción de la concentración de células viables (Schneider y col., 1996).

2.4.2.4 Membranas hidrofóbicas permeables a gas.

Las membranas hidrofóbicas permeables a gas permiten el transporte selectivo del amoníaco a través de ellas y su posterior remoción en el lado permeable. La fuerza motriz de este transporte es una diferencia en presiones parciales a través de la membrana. La membrana está en contacto con el medio de cultivo y se coloca un ácido en el lado permeable, debido a la naturaleza hidrofóbica de la membrana, los líquidos acuosos de ambos lados no penetran en sus poros y son separados perfectamente uno del otro. El NH_3 volátil se difunde a través de la membrana y es atrapado por el ácido del lado permeable como resultado de una protonación instantánea e irreversible. El uso de membranas de poros hidrofóbicos para remover amonio tiene un considerable potencial, particularmente para sistemas con altas concentraciones celulares tales como aquellos que involucran células inmovilizadas.

Capiamont y col. (1995) cultivaron células de mamífero en combinación con un sistema de membranas hidrofóbicas, obteniendo eficiente remoción de NH_3 . Colocaron un modulo de fibras huecas a un biorreactor con hibridomas inmovilizados. Observaron un incremento en la concentración celular de 60% en comparación con el control. Sin embargo, la concentración de anticuerpo no aumentó significativamente y el incremento en concentración celular no fue confiable ya que las células fueron separadas hasta después que terminó el experimento y éste se efectuó solo una vez.

Hecht y col. (1989) en cultivos por lote utilizaron un modulo de fibras huecas con membrana hidrofóbica microporosa acoplado al reactor. El modulo de membrana funcionó durante tres días para mantener la concentración de amonio abajo de 1 mM. La concentración celular fue 1.6 veces mayor en el cultivo destoxificado con respecto al control y solo obtuvieron un pequeño incremento en producción de AcM.

Schneider y col. (1997) realizaron cultivos por lote de hibridomas en combinación con un sistema de membrana hidrofóbica porosa. En el medio de cultivo libre de suero con 4 y 10 mM de Gln inicial los cultivos con y sin remoción de amonio mostraron el mismo patrón. La

concentración de amonio se redujo 41 % en los experimentos con 4 mM de Gln inicial y 44 % en los experimentos con 10 mM, comparados con el experimento control sin remoción de amonio. Los cultivos por lote realizados en medio suplementado con suero proporcionaron resultados similares a aquellos en medio libre de suero. La acumulación de amonio fue eficientemente reducida de una concentración final de 4 mM a 1.7 mM.

Una desventaja de estos sistemas es que requieren de una gran área de membrana para que la remoción de amonio sea eficiente.

2.4.2.5 Eliminación de amonio por diálisis.

Mediante el uso de membranas de diálisis se puede realizar la eliminación de los desechos metabólicos tóxicos de bajo peso molecular, reponer algunos nutrientes esenciales por el mismo mecanismo y simultáneamente concentrar los productos de interés de alto peso molecular, simplificando las operaciones de recuperación y purificación.

Linardos y col. (1992) realizaron cultivos dializados de hibridomas por lote y continuos. Para ello utilizaron un tubo de diálisis de celulosa (diámetro de corte de peso molecular de 1000) enrollado dentro del biorreactor por el cual hicieron pasar medio fresco sin suero a velocidades de flujo de 2 a 5 L/d. En la modalidad por lote, el proceso de diálisis resultó en un incremento del doble en concentración celular máxima y 3 veces en producción de AcM. En el cultivo continuo con una velocidad de dilución de 0.45 d^{-1} , utilizando un flujo de diálisis de 5 L/d, obtuvieron un 40% de incremento en concentración celular viable y producción de AcM en comparación con una corrida continua típica a la misma velocidad de dilución. Las concentraciones de amonio y lactato fueron significativamente más bajas que en el control. Es importante notar que alcanzaron el incremento en producción de AcM usando el medio de diálisis libre de suero. Por lo tanto un eficiente cultivo dializado puede ser mas económico que un cultivo continuo convencional.

Bohmann y col. (1995) utilizaron un biorreactor continuo de unidades de camas fijas de flujo radial acopladas con un modulo de diálisis. Realizaron dos grupos de experimentos. En el grupo (I), variaron la velocidad de dilución de la cámara interior y mantuvieron constante la velocidad de flujo en la cámara exterior. En el grupo (II), mantuvieron la velocidad de dilución constante en la cámara interior y variaron la velocidad de dilución en la cámara exterior. Mediante el ajuste de las velocidades de dilución en las cámaras interior y exterior lograron mantener la concentración de sustratos por arriba de los niveles límite y la de metabolitos

tóxicos por abajo de los niveles inhibitorios. El nivel de componentes del medio de alto peso molecular no tuvo influencia sobre la actividad de las células inmovilizadas dentro del rango de las velocidades de dilución analizadas. Comparado con los cultivos de quimiostato con células suspendidas, pudo obtenerse una concentración 10 veces mayor de AcM (383 mg/l). La velocidad específica de producción de anticuerpo volumétrica más alta fue de 6.1 mg de AcM /cama-fija h.

No obstante, el uso de membranas de diálisis también presenta problemas importantes, por ejemplo, la obstrucción de las membranas ya sea por proteínas del medio o por adhesión de células. Además, las células inmovilizadas no son accesibles a muestreo directo, cuenta y análisis, lo cual limita la utilidad de estos sistemas.

2.4.2.5.1 Electrodiálisis.

Chang y col. (1995a) diseñaron una técnica electrocinética basada en un mecanismo electroforético para eliminar amonio y lactato *in-situ* de un cultivo suspendido de hibridomas. Para ello utilizaron una cámara de cultivo dividida en tres compartimentos por dos marcos con papel filtro. Las células se confinaron dentro del compartimento central. Para aplicar el campo eléctrico de corriente directa de 50 A/m², utilizaron dos pares de puentes de sal colocados en serie, el primero con una terminal insertada en la cámara de cultivo y la otra inmersa en medio de cultivo sin suero. El segundo puente con una terminal insertada en éste mismo medio y la otra en una solución de NaCl/NaHCO₃.

Utilizando esta técnica en un cultivo por lote, obtuvieron un incremento de 37 y 35 % en la concentración celular viable máxima y título de anticuerpo monoclonal en comparación al cultivo control. La concentración de amonio en el cultivo electrocinético se mantuvo abajo de 1.5 mM y la de lactato abajo de 5 mM, mientras que en el cultivo control fueron 7.5 mM y 8 mM respectivamente. Además, realizaron cultivos por lote alimentado con una concentración inicial de Gln de 4 mM y alimentaron una concentración adicional de 4 mM a la mitad de la fase exponencial. Al final del periodo de cultivo, la concentración de células viables, células totales y AcM fueron 50, 84 y 55 % más en el cultivo electrocinético que en el cultivo control. Asimismo, en el cultivo electrocinético la concentración de amonio se mantuvo abajo de 3 mM, mientras que en el cultivo control se acumuló hasta 7.2 mM.

Chang y col. (1995b) realizaron cultivos por lote alimentado en medios de cultivo enriquecidos, en los cuales removieron amonio y lactato *in situ* aplicando densidades de

corriente eléctrica en el rango de 70 a 90 A/m². Utilizaron dos tipos de medio enriquecido, en los cuales la concentración de los aminoácidos esenciales y vitaminas fue 5 y 10 veces más que la del medio mínimo MEM. En estos cultivos alimentaron una solución de Gln 200 mM y una de glucosa 1.0 M para reponer el agotamiento de estos nutrimentos en el medio. Además, prepararon un medio suplementario que contenía 20 veces más todos los aminoácidos y 40 veces más vitaminas que en MEM, este medio solo lo alimentaron en el cultivo donde utilizaron el medio con la concentración de los aminoácidos esenciales y vitaminas 10 veces más que MEM.

En el cultivo electrocinético con 5 veces más aminoácidos esenciales y vitaminas, la concentración de células viables máxima, células totales final y AcM final fueron 50, 38 y 90 % más respecto al cultivo control. En el cultivo electrocinético con 10 veces más aminoácidos esenciales y vitaminas, el cual fue alimentado con el medio suplementario, la concentración de células viables máxima, células totales y AcM alcanzado fueron aproximadamente el doble que para el cultivo con 5 veces más aminoácidos esenciales y vitaminas control. El amonio producido en los cultivos electrocinéticos fue removido eficazmente y su concentración permaneció abajo de 2.0 mM.

Sin embargo, la técnica electrocinética presenta desventajas, ya que el uso de ésta solamente puede intercambiar selectivamente un soluto cargado por otro, sin alterar la cantidad total de estos, por lo tanto, la elevada osmolaridad debida a la acumulación de lactato no puede ser reducida por el campo eléctrico de corriente directa. Además, debido a la complejidad de esta técnica resulta un gran reto su escalamiento.

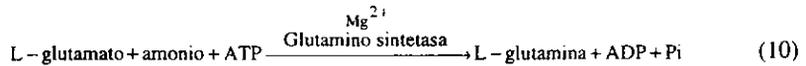
2.5 Enzimas con capacidad de eliminar amonio.

Existen distintas enzimas que se podrían utilizar para eliminar el amonio. Entre estas, las más comunes son la glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2), glutamato deshidrogenasa (C 1.4.1.3), fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5) y aspartato amonio liasa (EC 4.3.1.1). Sin embargo, no todas se pueden utilizar para eliminar el amonio de el medio de cultivo de CES debido a que el pH, temperatura y concentración de amonio necesarios para que las reacciones ocurran deben ser compatibles con las condiciones de cultivo.

Las enzimas que tienen un pH y temperatura de reacción próximos a las condiciones adecuadas para el cultivo de CES son la glutamino sintetasa y la glutamato deshidrogenasa.

2.5.1 Glutamino sintetasa.

La glutamino sintetasa (GS) es una enzima que cataliza la formación reversible de glutamina a partir de glutamato y amonio a expensas de la hidrólisis de ATP a ADP y Pi.



La síntesis de glutamina provee a muchos tipos de células con un mecanismo para remover el amonio y para su almacenamiento.

La GS de *E. coli* (EC 6.3.1.2) es una importante enzima en el consumo de amonio, tiene un peso molecular de 600 000, es oligomérica y consta de 12 subunidades idénticas, arregladas en dos capas hexagonales. Su actividad es regulada por modificación covalente y alostéricamente. Además, es susceptible a un amplio rango de efectores: inhibición por algunos productos finales del metabolismo de glutamina incluyendo glicina, alanina, triptofano, histidina, citidina trifosfato (CTP) y citidina monofosfato (CMP). Cada producto ejerce una inhibición acumulativa de la actividad por unirse a sitios reguladores. En adición, GS está sujeta a modificaciones covalentes por adenilación de un residuo de tirosina 397. La reacción de adenilación es catalizada por la enzima adenil transferasa, la cual transfiere el grupo AMP del ATP al residuo de tirosina. La modificación de adenilación es reversible y es a su vez controlada por un mecanismo de cascada bicíclico, el cual puede ocurrir sobre las 12 subunidades conduciendo a una completa pérdida de actividad. También es regulada a nivel de transcripción por la concentración de amonio y otras fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo.

El efecto de adenilación sobre una subunidad dada es cambiar el requerimiento del ion metálico divalente para una óptima actividad. La subunidad desadenilada muestra máxima actividad con Mg^{+2} a pH 7.5 y éste es el metal fisiológicamente importante. La subunidad adenilada por otro lado muestra máxima actividad con Mn^{+2} a pH 6.5 (Abell y Villafranca, 1990).



Existen estados intermediarios *in vivo*, los cuales tienen actividad parcial. Los estados intermediarios muestran diferentes sensibilidades hacia efectores. Por ejemplo, GS_0 es sensible

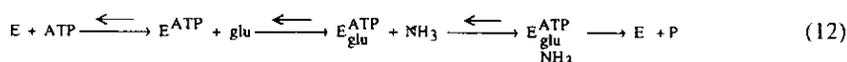
a alanina, glicina y AMP, mientras que GS-(AMP)₁₂ es mas sensible a histidina, triptofano y CTP. La adenilación es catalizada por adenilil transferasa en la presencia de una segunda proteína, P_{II}. La adenilación y desadenilación de GS son catalizadas por una sola enzima, pero las reacciones separadas son catalizadas por las formas modificada y no modificada de la proteína P_{II} respectivamente. Esta ultima puede ser modificada covalentemente por UTP y por residuos de tirosina.

Los procesos de adenilación y desadenilación, uridilación y desuridilación catalizados por enzimas, son modificados por efectores. Ambos procesos son particularmente sensibles a cambios en la concentración de α -cetoglutarato y glutamina, las cuales respectivamente incrementan y disminuyen las formas activas de la enzima. Así la GS es responsable de un amplio rango de efectores y por lo tanto de las necesidades de la célula.

Entre otros inhibidores de la GS, se pueden listar ADP, L-alanina, AMP, Glucosamina 6-fosfato, glicina, fosfato, L-serina, entre otros (Helmward, 1993).

Mecanismo cinético:

El mecanismo que ha sido propuesto para esta enzima involucra la formación inicial del intermediario γ -glutamil fosfato de ATP y glutamato, seguido por desplazamiento del grupo fosfato por amonio. (Abell y Villafranca, 1990).



La función catalítica propuesta para los dos iones metálicos divalentes es ampliamente diferente y se distingue una de la otra por sus constantes de disociación. La fuerte unión del ion n₁ se piensa que mantiene a la enzima en su conformación catalíticamente activa. La unión menos fuerte del ion metálico se piensa que está involucrada en la unión del nucleótido así como en la transferencia del fosfato (Abell y Villafranca, 1990).

2.5.1.1 Aplicaciones biotecnológicas de la glutamino sintetasa.

La enzima glutamino sintetasa se ha utilizado en algunas aplicaciones biotecnológicas como las siguientes:

Wakisaka y col. (1989) utilizaron un sistema enzimático constituido por la glutamino sintetasa y la glutamato sintetasa purificadas, para la formación *in vitro* de glutamato con

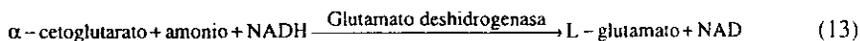
regeneración de ATP y NADPH, con la finalidad de estudiar el mecanismo fisiológico de la vía GS/GOGAT en *B. flavum*. Eligieron las concentraciones de enzimas y sustratos de acuerdo a las condiciones intracelulares. El objetivo fue comparar los cambios de la concentración de aminoácidos causados por la adición de amonio al sistema, con la concentración intracelular de glutamato y glutamina cuando el amonio se adicionaba al cultivo bacteriano.

Tabata y Kido (1991) aplicaron un método enzimático para eliminar el amonio de una mezcla de reacción mediante la glutamino sintetasa inmovilizada, utilizaron además la creatinina deaminasa y glutamato deshidrogenasa para la determinación automatizada de creatinina en orina. El método está basado en la medición de la disminución en absorbancia a 340 nm del NADPH, producido por reacciones sucesivas de creatinina deaminasa y glutamato deshidrogenasa con creatinina, en una mezcla de reacción en la cual el amonio es eliminado mediante la reacción catalizada por la glutamino sintetasa.

2.5.2 Glutamato deshidrogenasa.

La enzima glutamato deshidrogenasa de hígado bovino (EC 1.4.1.3) es una enzima alosterica de 336 kDa que está compuesta de seis subunidades idénticas en su forma activa, la cual cataliza la desaminación reversible de L-glutamato.

La reacción que cataliza esta enzima en presencia del NADH es:



Cada subunidad de 56 kDa tiene un sitio activo y sitios regulatorios para NAD(P), ADP y GTP. La secuencia de aminoácidos de los seis monómeros son idénticas y están arreglados en dos capas de tres. En esta estructura cuaternaria la GDH sufre cambios conformacionales que son inducidos por la unión del aminoácido, NAD(P), ADP, GTP y sus análogos (O'Connor y Bailey, 1989).

La enzima se inhibe por GTP y por altas concentraciones de NADH, los cuales se unen a un sitio regulador distinto del sitio catalítico. El inhibidor alosterico GTP ocupa dos sitios por subunidad de enzima en la presencia de NADH, pero solo un sitio en la ausencia de la coenzima reducida. El activador alosterico ADP así como la coenzima NADH ocupan cada uno dos sitios por subunidad, mientras que el ATP funciona como un activador alosterico (Ozturk y col., 1990 y 1991)

El K_m para L-glutamato y α -cetoglutarato es de 1.8×10^{-3} y 7×10^{-4} M respectivamente; su pH óptimo va de 8.5 a 9.0 para la oxidación de glutamato y de 7.8 para la aminación reductiva (Gerhartz, 1990).

2.5.2.1 Aplicaciones biotecnológicas de la glutamato deshidrogenasa.

La glutamato deshidrogenasa ha tenido aplicación en algunos procesos biotecnológicos tales como los que se describen a continuación:

Gu y Chang (1987) diseñaron un sistema de multienzimas inmovilizadas por microencapsulación dentro de células artificiales en un biorreactor, para la conversión de α -cetoglutarato a ácido L-glutámico con urea como fuente de amonio. El multisistema enzimático contenía glutamato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, ureasa y dextran-NAD⁺.

Lin y col. (1997) usaron una membrana de nanofiltración para la inmovilización de coenzima, en la construcción de un reactor para la reducción de ácido 2-cetoglutarico a ácido L-glutámico con regeneración de NADH. En este reactor enzimático, un sistema conjugado de glutamato deshidrogenasa y glucosa deshidrogenasa fueron coinmovilizadas. Se suministro continuamente una solución de sustrato conteniendo una baja concentración de NAD, debido a la retención por la membrana, el NAD fue parcialmente inmovilizado y concentrado en el reactor.

Kiba y col. (1992) desarrollaron un método de inyección de flujo para la determinación de L-glutamato en suero, utilizando un reactor con glutamato deshidrogenasa inmovilizada, el NADH formado fue detectado a 465 nm.

Canale y col. (1990) diseñaron un sistema de análisis de inyección de flujo, utilizando la glutamato deshidrogenasa inmovilizada en combinación con un detector espectrofotométrico, para la determinación de amonio en alimentos. Niveles altos de amonio en productos tales como carne y pescado indican que no son frescos. La concentración de amonio se infirió al medir la disminución de la absorbancia con radiación UV al oxidarse el NADH.

CAPITULO III

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Eliminación enzimática selectiva de amonio del medio de cultivo de células de eucariotes superiores.

3.2 Objetivos específicos.

Establecimiento de las condiciones operacionales de los sistemas enzimáticos de la glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2) y glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.3), a las condiciones de pH, temperatura y concentración de sustratos dadas en los cultivos de células de eucariotes superiores.

Evaluación del comportamiento de los sistemas enzimáticos en el medio de cultivo sin células.

Evaluación de los sistemas enzimáticos de la glutamino sintetasa y glutamato deshidrogenasa en cultivo de células, usando dos modelos:

- a) Hibridomas murinos productores de anticuerpos monoclonales.
- b) Células de insecto, *Spodoptera frugiperda* (Sf-9).

CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS

4.1 Líneas celulares.

Se utilizaron dos líneas celulares, una de hibridomas murinos denominada BCF2 y la otra de células de insecto Sf-9. La línea de hibridomas secreta AcM neutralizantes y específicos a la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann la cual fue generada en el laboratorio del Dr. L. Possani del Instituto de Biotecnología de la UNAM y es descrita en detalle por Zamudio y col. (1992). En breve, la línea proviene de la fusión de células del bazo de un ratón, inmunizado con la fracción II-9.2 del veneno acoplada con tiroglobulina, y una subclona del mieloma SP2/O-Ag 14 de ratón. Los hibridomas fueron clonados y seleccionados *in situ* al cultivarlos sobre una capa alimentadora de macrófagos de ratón. El veneno de la especie de alacrán *Centruroides noxius* Hoffman se obtuvo por estimulación eléctrica de los alacranes vivos y las diversas toxinas del veneno fueron purificadas por técnicas cromatográficas. El AcM obtenido inhibe la unión de la toxina con las membranas sinaptosomales de cerebro de ratón y muestra una clara actividad neutralizante *in vivo*.

La línea celular Sf-9 (Número de catalogo de la ATCC 1711) proviene del ovario de pupa del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (conocido comúnmente en México como gusano cogollero del maíz y en Estados Unidos como gusano soldado de otoño). Esta línea fue clonada por Smith y col. (1983) a partir de la línea Sf-21, obtenida por Vaughn y col. (1979) en 1977.

4.2 Medios de cultivo.

El medio de cultivo que se utilizó para las células de hibridoma fue el Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma D-5030). Se prepara disolviéndolo con agua destilada, desionizada y estéril y suplementándolo con glucosa (4 g/l), glutamina (0.584 g/l), piruvato de sodio (0.1155 g/l), bicarbonato de sodio (2.2 g/l), ác. oxalacético (13.2 mg/l), insulina cristalina (0.8 mg/l), solución 100X de aminoácidos no esenciales (1% v/v; Sigma M 7145), solución antibiótica/antimicótica [penicilina (100,000 U/l), estreptomycin (100 mg/l), anfotericina B (250 µg/l); Sigma A-9909], rojo fenol (15.9 mg/l) y suero fetal bovino (SFB) a una concentración final de 10 % (Sigma F-2449). El medio se esteriliza por filtración (membrana Millipore, 0.22 µm) y puede conservarse a 4 °C por no más de un mes.

El medio de cultivo que se utilizó para las células de insecto fue TNM-FH (*Trichoplusia ni* medium-Fred Hink, Sigma. T-1032). Se prepara disolviéndolo con agua destilada, desionizada y estéril y se ajusta a pH 6 con hidróxido de sodio 1M. Se esteriliza por filtración a través de membrana de 0.22 μm y se suplementa con 10 % de SFB (Sigma F-2449) y con 0.05% de Pluronic F-68 (BASF). El medio queda a pH 6.2 después de filtrar.

4.3 Congelación de células.

Suspensiones con alrededor de un millón de células se centrifugaron a 800 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspende con medio de congelación (constituido por 50 % DMEM con 40% de SFB y 10% de dimetil sulfóxido v/v) para dar una concentración final de aproximadamente 5×10^6 cél/ml. Esta suspensión se distribuye en viales de congelación estériles (1-1.5 ml), los cuales son conservados a -70 °C durante un día y almacenados posteriormente en nitrógeno líquido hasta su uso.

4.4 Inóculo.

Los inóculos utilizados para los cultivos experimentales de células de hibridoma, se obtuvieron de viales criopreservados conteniendo células conservadas en medio constituido por 50 % DMEM con 40% de SFB y 10% de dimetil sulfóxido v/v. Los viales se conservan en nitrógeno líquido y cuando se requiere un inóculo, las células se descongelan a 37 °C y son transferidas inmediatamente a un tubo de centrifuga cónico. Se adiciona lentamente 10 ml de medio de cultivo DMEM por cada tubo descongelado y se mezcla suavemente. Posteriormente se centrifuga la suspensión a 600-700 rpm durante 15 minutos, se desecha el sobrenadante y se resuspende el paquete celular en 10 ml de medio DMEM. La suspensión celular se coloca en un frasco T de 25 cm^2 de área superficial y se subcultivan tres veces por lo menos antes de preparar el inóculo. Los inóculos se preparan cultivando las células en frascos T de poliestireno de área superficial de 25 y 75 cm^2 y colocándolos en una incubadora de CO_2 a 37 °C y 6 % de CO_2 .

Los inoculos para los cultivos de células de insecto se obtuvieron a partir de un mismo lote de células congeladas en nitrógeno líquido. Las células para inóculo se mantuvieron en cultivo en frasco T a 27 °C. Todos los inóculos se realizaron con células en fase de crecimiento exponencial a una concentración de 0.2×10^6 cél/ml y con una viabilidad mayor al 90 %.

4.5 Cultivos estáticos por lote.

Todos los cultivos de hibridomas fueron estáticos y se realizaron en frascos T de 75 cm² (Costar 3375) a 37 °C y con una atmósfera de CO₂ al 6% . Se iniciaron los cultivos con una concentración de células viables entre 0.15 x 10⁶ y 0.2 x 10⁶ cél/ml. Se realizaron cultivos con medio DMEM de formulación convencional y cuando se utilizó el sistema enzimático fue necesario modificar la concentración de NaCl para que la osmolaridad fuera cercana a 340 mOsmolar. Los cultivos se siguieron hasta que la viabilidad disminuyó a menos de 50%. Se tomaron muestras aproximadamente cada 12 horas de las cuales se monitoreó la concentración celular y una alícuota se centrifugó para eliminar las células. El medio sobrenadante se guardó a -20 °C para su posterior análisis.

Los cultivos estáticos con células de insecto se realizaron en frascos T de 75 cm². Las células se despegaron de los frascos por medio de ligeros golpes con la palma de la mano y por medio del flujo de una pipeta de 10 ml, esto se realizó cada vez que era necesario tomar muestra o para subcultivar.

4.6 Cultivos en frasco agitado.

Los cultivos de células de insecto en suspensión se realizaron en frascos agitados 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 suspendida a 0.3 cm del fondo del frasco.

4.7 Métodos analíticos.

4.7.1 Determinación de la concentración celular.

La concentración celular se determinó utilizando un contador de partículas Coulter (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics) con un tubo de apertura de 100 µm. Para diluir las muestras se utilizó solución isotónica Isotón II (Coulter, 7546719). La viabilidad celular se determinó por la técnica de exclusión de azul de tripano en un hematocitómetro (las células muertas se tiñen de azul) como el porcentaje de células vivas del total.

4.7.2 Determinación de glutamato y glutamina.

Las concentraciones de glutamato y glutamina se determinaron enzimáticamente en un analizador YSI modelo 2700 (Yellow Spring Instruments). Este analizador utiliza membranas con enzimas inmovilizadas: L-glutamato oxidasa para medir glutamato y glutaminasa y L-glutamato oxidasa para medir glutamina. La enzima L-glutamato oxidasa catalizan la reacción entre L-glutamato en la muestra y el oxígeno, formando α -cetoglutarato, amoniaco y peróxido de hidrógeno. El flujo de corriente en el circuito del ánodo de platino es linealmente proporcional a la concentración de glutamato. A su vez, la L-glutamina se transformó a L-glutamato por medio de la glutaminasa y posteriormente a α -cetoglutarato, amoniaco y peróxido de hidrógeno por la L-glutamato oxidasa. En la determinación simultánea de L-glutamina y L-glutamato en el YSI la concentración de L-glutamina es estequiométricamente proporcional a la concentración de L-glutamato derivada de L-glutamina y corresponde a la diferencia de la concentración de L-glutamato total (el presente en la muestra más el derivado de L-glutamina) menos la concentración de L-glutamato inicial presente en la muestra.

4.7.3 Determinación de amonio.

El amonio se cuantificó utilizando el método del indofenol, propuesto por Kaplan (1965) y modificado para intensificar la sensibilidad del método a concentraciones menores de 6 mM.

Esta determinación se debe realizar en una campana de extracción y tener la precaución de no inhalar los compuestos volátiles como las cloraminas que se desprenden durante la reacción, las cuales son carcinogénicas.

Para elaborar la curva de calibración se prepararon las siguientes soluciones en agua destilada desionizada y hervida.

Solución A : Fenol 0.106 M, nitroprusiato de sodio 0.17 mM.

Solución B : Hidróxido de sodio 0.125 N, hipoclorito de sodio 11 mM.

Solución de amonio :

A partir de una solución de cloruro de amonio 1 M, se preparan los estándares de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mM en matraces aforados de 10 ml agitando hasta lograr homogeneidad.

Para la lectura de los estándares se tomaron 25 µl de cada uno y se colocaron en un tubo de ensaye de aproximadamente 5 ml de capacidad provisto de tapa con rosca. Se agregó a cada tubo 1 ml de la solución A, se taparon y se agitaron vigorosamente, después se agregó 1 ml de la solución B, se taparon y se agitaron de igual manera. A partir de este momento se dejaron reposar 30 minutos para que se desarrollara el color "azul de prusia" característico. Se tomó una alícuota de cada tubo y se leyó en el espectrofotómetro a 635 nm, el cual se ajustó a cero previamente con un blanco (1 ml de solución A y 1 ml de la solución B). Las lecturas de absorbancia y los valores de concentración se ajustaron a una línea recta por el método de mínimos cuadrados, determinando los valores de la pendiente y ordenada al origen para caracterizar la curva de calibración. Es necesario reportar el coeficiente de correlación en cada caso, con el fin de documentar la dispersión de las muestras sobre la curva estandar.

Para la determinación rutinaria de amonio, se tomaron 25 µl de muestra del medio de cultivo libre de células y se siguió el mismo procedimiento descrito arriba para los estándares.

Para la determinación de amonio, inicialmente se utilizó un micro electrodo de amonio (MI-740 micro-ammonia electrode), pero desafortunadamente se tuvieron problemas de estabilidad de la lectura del mismo entre la elaboración de la curva de calibración y la lectura de las muestras.

4.7.4 Determinación de ortofosfato.

Con la finalidad de poder cuantificar indirectamente la concentración de ATP consumido durante la reacción con la enzima GS, se determinó la concentración de ortofosfato. Para ello se utilizó el método del molibdato, el cual permite cuantificar fosfato inorgánico linealmente aún a concentraciones arriba de 60 nmol, con una estabilidad hasta por 5 h de el color desarrollado y con baja interferencia por concentraciones de ATP tan altas como 30 mM. El método es muy adecuado para uso en ensayos enzimáticos de ATPasas, especialmente con enzimas que tienen baja actividad específica y/o altos valores de K_m para ATP (González y col., 1992)

Las siguientes soluciones fueron hechas con agua doblemente destilada y en recipientes de cristal previamente lavados con extran y remojados en H_2SO_4 concentrado por al menos 24 h.

Solución A: 12 % de SDS (dodecil sulfato de sodio).

Solución B: 12 % de ácido ascórbico en 1N de HCl.

Solución C: 2 % de molibdato de amonio en HCl.

Solución D: Mezcla de 1 ml de la solución B con 1 ml de la solución C.

Solución E: 2 % de citrato de sodio y 2 % de meta arsenito de sodio en 2 % de ácido acético en H₂O.

Las soluciones B y C permanecen estables por 2 meses a 4 °C. La solución D se torna amarilla con el tiempo, por lo que debe usarse dentro de las siguientes 24 h de su preparación. Para la curva estandar se prepara una solución 100 mM de K₂HPO₄ el cual ha sido secado previamente. A partir de esta solución se preparan estandares de 0, 0.05, 0.15, 0.2, 0.25, 0.35, 0.4, 0.45, 0.55, 0.6 mM.

En diferentes tubos de ensaye de aproximadamente 5 ml, se colocan 150 µl de cada uno de los estandares. En seguida, se adicionan 150 µl de la solución A a cada tubo, se mezcla y posteriormente se adicionan 300 µl de la solución D. Transcurridos 5 minutos se adicionan 450 µl de la solución E y se mezcla. Las muestras se dejan reposar por 20 minutos a temperatura ambiente y se leen en el espectrofotómetro a 850 nm.

Para la determinación rutinaria del ortofosfato se sigue el mismo procedimiento, pero en vez de 150 µl de estandar se colocan 150 µl de muestra.

4.7.5 Determinación de la actividad enzimática de la glutamino sintetasa.

Para determinar la actividad de un extracto de glutamino sintetasa se preparan las siguientes soluciones con agua destilada, desionizada y hervida.

Solución A: Clorhidrato de imidazol 1 M a pH 7.2.

Solución B: Glutamato de sodio 1 M.

Solución C: ATP 0.2 M a pH 7.2.

Solución D: Cloruro de magnesio 3 M.

Solución E: Cloruro de amonio 1 mM.

Solución F: 12 % de SDS (dodecil sulfato de sodio).

Solución G: 12 % de ácido ascórbico en 1N de HCl.

Solución H: 2 % de molibdato de amonio en HCl.

Solución I: Mezcla de 1 ml de la solución G con 1 ml de la solución H.

Solución J: 2 % de citrato de sodio y 2 % de meta arsenito de sodio en 2 % de ácido acético en H₂O.

Para el ensayo; se procede de la siguiente forma: en un tubo de ensaye de 5 ml se adicionan 0.25 ml de la solución A, 0.5 ml de la solución B, 0.1 ml de la solución D, 0.2 ml de la solución E y 1.33 ml de agua destilada, desionizada y hervida. A 0.2 ml de extracto de enzima se agregan 0.24 ml de la mezcla de reacción anterior, se incuba 5 minutos a 37 °C y la reacción empieza con la adición de 0.06 ml de la solución C a 37 °C (El blanco se prepara de la misma manera, pero en vez del extracto de enzima se coloca agua destilada.). Después de 15 minutos se detiene la reacción adicionando 150 µl de la solución F, posteriormente se adicionan 300 µl de la solución I. Después de 5 minutos se adicionan 450 µl de la solución J y se mezcla. Las muestras se dejan reposar por 20 minutos a temperatura ambiente y se leen en el espectrofotómetro a 850 nm.

La actividad de la glutamino sintetasa se reporta como µmol de fosfato generado debido a la degradación enzimática de ATP por cada 0.2 ml de extracto de enzima por 15 minutos.

Una unidad se define como la cantidad de enzima que convierte 1 µmol de L-glutamato a L-glutamina en 15 minutos a pH 7.1 y 37 °C.

4.7.5.1 Ensayo de gama transferasa (γ GT).

Este ensayo se utiliza para medir la actividad de glutamino sintetasa total presente, ya que tanto la forma adenilada como la desadenilada son activas en esta prueba (Bender y col., 1977).

Las siguientes soluciones se preparan con agua destilada, desionizada y hervida.

Solución A: Clorhidrato de imidazol 1 M pH 7.15.

Solución B: Clorhidrato de hidroxilamina 0.8 M.

Solución C: Cloruro de manganeso 0.10 M.

Solución D: Arsenato de potasio 0.28 M pH 7.15.

Solución E: ADP 40 mM pH 7.

Solución F: CTAB 1 mg/ml.

Solución G: L glutamina 0.2M.

Solución H: 55 g de cloruro férrico hexahidratado, 20 g de ácido tricloroacetico y 21 ml. de ácido clorhídrico concentrado. Aforar a un litro.

La solución F es un detergente que hace permeable la membrana de las células a los reactivos, puede ser reemplazada con agua cuando se ensaya la enzima purificada o extracto crudo en lugar de células íntegras.

La mezcla de reacción se prepara colocando en un tubo de ensayo de 15 ml las siguientes soluciones concentradas en el orden y proporción como se especifica a continuación: 7.53 ml de agua destilada, desionizada y hervida, 2.25 ml de la solución A, 0.37 ml de la solución B, 0.045 ml de la solución C, 1.5 ml de la solución D, 0.15 ml de la solución E y 1.5 ml de la solución F. El pH de la mezcla se ajusta con ácido clorhídrico 1M o hidróxido de potasio 2 M. si no se usa inmediatamente se conserva a 4 °C. Esta mezcla una vez preparada debe utilizarse dentro de las siguientes 24 h. Se prepara un blanco de la misma manera reemplazando las soluciones de el arsenato y ADP con agua. A 0.40 ml de la mezcla de ensayo se le agrega la muestra y agua para dar un volumen de 0.45 ml, la solución se mantiene a 37 °C por 5 minutos y la reacción se inicia por la adición de 0.050 ml de solución G. La reacción se termina adicionando 1 ml de la solución H.

Las muestras se centrifugan para remover cualquier precipitado antes de medir absorbancia a 540 nm.

Bajo estas condiciones 1 μ mol de glutamil-hidroxamato da 0.532 unidades de absorbancia a 540 nm.

Una unidad de actividad de GS es definida como la cantidad de enzima **que** produce 1 μ mol de glutamil-hidroxamato por min.

4.7.5.2 Ensayo de reacción de sintetasa.

El ensayo de la reacción de sintetasa es una medida de la capacidad de la enzima glutamino sintetasa para formar glutamina (Bender y col., 1977).

Las siguientes soluciones se preparan con agua destilada, desionizada y hervida.

Solución A: Clorhidrato de imidazol 1 M pH 7.15.

Solución B: Clorhidrato de hidroxilamina 0.8 M.

Solución C: Cloruro de magnesio 3M.

Solución D: L-glutamato monosódico 0.85 M.

Solución E: CTAB 1 mg/ml.

Solución F: ATP 0.20 M pH 7.7 ajustado con hidróxido de potasio 2 M.

Solución G: 55 g de Cloruro férrico hexahidratado, 20 g de ácido tricloroacético y 21 ml de ácido clorhídrico concentrado. Aforar a un litro.

La mezcla de reacción se prepara colocando en un tubo de ensaye de 20 ml las siguientes soluciones concentradas en el orden y proporción como se especifica a continuación: 7.2 ml de agua destilada, desionizada y hervida, 2.0 ml de solución A, 1.25 ml de solución B, 0.40 ml de solución C, 4.2 ml de solución D, 2.0 ml. de solución E. Se ajusta a pH 7.7 con hidróxido de potasio 10 M a temperatura ambiente. A 0.40 ml de la mezcla de ensayo concentrada se adiciona la muestra y agua para dar un volumen de 44 ml. La solución se mantiene a 37 °C por 5 minutos y la reacción se inicia por la adición de 0.060 ml de la solución F. La reacción se detiene adicionando 1.0 ml de la solución G. Esta mezcla es agitada en un vortex para disolver el precipitado que se forma transitoriamente por la adición de la solución G. Las muestras se centrifugan para remover cualquier precipitado remanente y se lee la absorbancia a 540 nm. El blanco se realiza sin ATP o con células que carecen de glutamino sintetasa.

4.7.6 Determinación de osmolaridad.

La osmolaridad se determinó por medio de un micro osmometro (Precision Systems μ Osmette). Se colocan 50 μ l de la solución a analizar en un tubo eppendorf nuevo, sumergiendo el sensor en la muestra y se toma la lectura una vez que se alcanza un valor estable.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

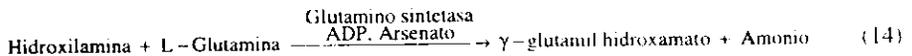
5.1 Establecimiento de las condiciones de reacción de la glutamino sintetasa.

Para evaluar la actividad de esta enzima se utilizaron los siguientes ensayos:

- a) Ensayo de gamma transferasa (γ GT).
- b) Sintetasa.

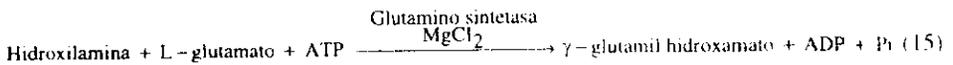
La ventaja adicional de estos ensayos es que además de permitirnos determinar la actividad de la enzima es posible conocer el estado de adenilación de la misma.

La reacción para gamma transferasa es:



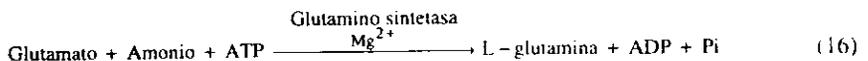
El γ -glutamil hidroxamato presenta una absorbancia máxima a 540 nm.

La reacción de sintetasa es:



Alternativamente, la reacción de sintetasa se puede determinar al cuantificar colorimétricamente el ortofosfato generado durante la reacción y realizando la corrección con un blanco en el cual no se coloca enzima, ya que el ATP puede llevar cierta cantidad de ortofosfato.

La reacción de síntesis de glutamina que cataliza la glutamino sintetasa es:



Para determinar la cantidad de enzima y la concentración de los reactivos adecuados para utilizar el sistema enzimático de la glutamino sintetasa en cultivos de hibridomas, se realizaron cinéticas en buffer clorhidrato de imidazol 34 mM ajustado a pH 7.2, utilizando diferentes concentraciones de enzima y reactivos. Se utilizó una concentración de reactivos menor a la utilizada en el ensayo para determinar la actividad de la enzima, pero suficiente para lograr eliminar 5 mM de amonio en 31 h que es un valor típico del acumulado en un cultivo por lote de hibridomas al final de la fase exponencial de crecimiento, que en ésta línea particular es de aproximadamente 70 h. El uso de una concentración de reactivos menor, fue con la finalidad de que al utilizar el sistema enzimático en cultivos de hibridomas, no se ocasionara un aumento significativo en la osmolaridad del medio con el consiguiente daño celular e inhibición del crecimiento, ya que la determinación de la actividad de la enzima se realiza a condiciones de saturación de sustratos.

Como primera aproximación, la concentración de los reactivos utilizada fue de 60 mM de cloruro de magnesio, 15 mM de ATP, 12.5 mM de glutamato de sodio y 5 mM de cloruro de amonio. Las concentraciones de enzima fueron de 0.4, 0.8 y 1 U/ml. En estas pruebas se realizó el seguimiento de la concentración de glutamato con el tiempo tomando las muestras en tubos de 1.5 ml con tapón de rosca y congelándolas en nitrógeno líquido para detener la reacción. Posteriormente se analizó la concentración de glutamato de las muestras.

El seguimiento de la concentración de glutamato y no de ortofosfato, obedece a que el primero es un aminoácido relativamente estable y su consumo está directamente relacionado con el consumo de amonio y generación de glutamina por la enzima GS. Por otro lado, en el caso del ortofosfato, este se puede generar por la hidrólisis del ATP la cual no necesariamente puede ser enzimática. Además el costo del análisis es mayor debido a que es necesario un blanco para corregir el ortofosfato que esta presente en el ATP, teniendo este último un precio muy elevado.

Como puede observarse en la **figura 5.1**, el consumo de glutamato en la reacción con la enzima a la concentración de reactivos mencionada anteriormente, denominado "valor experimental", fue menor que el consumo "teórico" que debería esperarse en condiciones de saturación de sustratos para la misma concentración de enzima, ya que la velocidad de reacción es una función de la concentración de sustrato. Por ejemplo, en un modelo como el de Michaelis Menten, se requiere que la concentración de sustrato sea por lo menos 10 veces el k_m para estar en saturación.

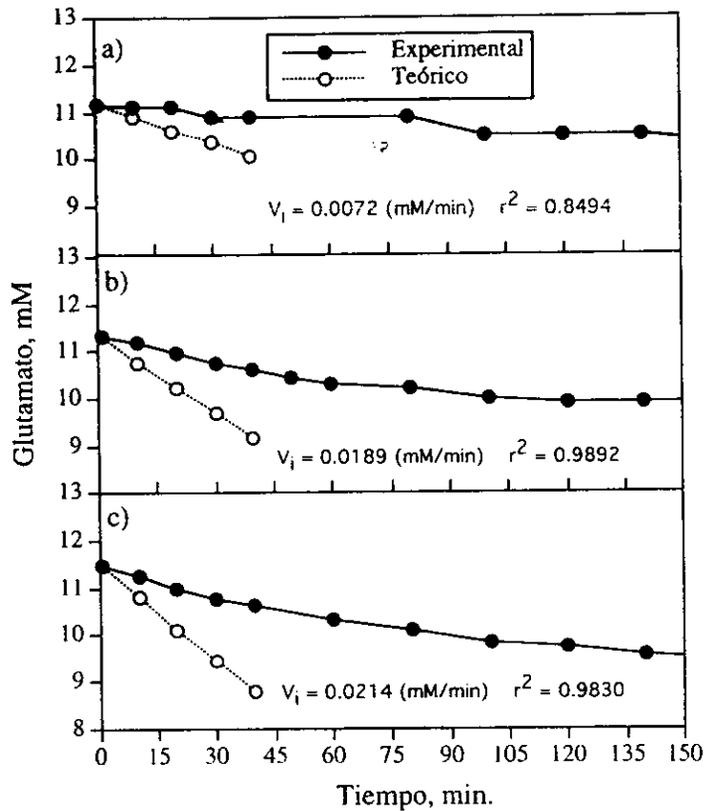


Figura 5.1.- Cinéticas de consumo de glutamato a diferentes concentraciones de enzima en buffer imidazol. La concentración de enzima fue: a) 0.4 U/ml, b) 0.8 U/ml, c) 1 U/ml.

En la **tabla 5.1** se presentan las velocidades iniciales obtenidas experimentalmente con la concentración de reactivos menor a la saturación y las que teóricamente se obtendrían en condiciones de saturación de sustratos. La velocidad inicial de consumo de glutamato " V_{\max} ", se determinó por regresión lineal de los primeros cinco datos, donde la pendiente es lineal. En el caso de las cinéticas a 0.8 y 1.0 Unidades/ml, se observó una tendencia más clara del consumo de glutamato. Además el valor de la relación V_{\max} experimental/ V_{\max} teórica nos indica que para estas concentraciones de reactivos, la actividad enzimática es aproximadamente tres veces menor a la actividad esperada a condiciones de saturación de sustratos.

Tabla 5.1.- Comparación de la velocidad de reacción inicial de la enzima glutamino sintetasa en buffer imidazol a concentración de sustratos menor a saturación con la velocidad inicial teórica a condiciones de saturación de sustratos.

Unidades / ml	V_i experimental mM/min	V_i teórica mM/min	% de V respecto a saturación.
0.4	0.0072	0.0272	26.470
0.8	0.0189	0.0544	34.74
1.0	0.0214	0.0680	31.47

El sistema de la glutamino sintetasa tiene la ventaja de que además de eliminar el amonio, regenera el aminoácido glutamina.

5.2 Inactivación de la enzima GS.

Para detener la reacción enzimática de la glutamino sintetasa se congelaron las muestras. Sin embargo, se estudió la posibilidad de establecer una metodología alternativa para detener la reacción enzimática y dar mayor estabilidad a la composición de las muestras para futuros análisis, ya que al descongelar estas, la actividad enzimática puede continuar ocasionando cambios en la composición de glutamina, glutamato, amonio y ATP.

Para detener la reacción por el método alternativo se utilizó el ácido etilendinitrilotetracético (EDTA) como quelante de los iones Mg^{2+} , dado que la enzima GS posee dos sitios de unión al ion Mg^{2+} (designados n_1 y n_2) que están localizados en el sitio activo y el ion Mg^{2+} es absolutamente necesario para la actividad. Este es un método de inactivación adecuado porque no daña los componentes lábiles del medio de cultivo, como es el caso de la Gln.

Con la finalidad de probar la eficiencia de esta metodología, se realizaron simultáneamente dos cinéticas en buffer clorhidrato de imidazol 34 mM ajustado a pH 7.2, con un cóctel de reacción constituido de 60 mM de cloruro de magnesio, 12.5 mM de glutamato de sodio, 15 mM de ATP, 5 mM de cloruro de amonio y 1 unidad/ml de enzima. A una de las reacciones se le agrego EDTA en la misma relación molar al Mg^{+2} a los 50 min de reacción y se comparó con un control. Se tomaron muestras cada 10 minutos en tubos de 1.5 ml con tapón roscado y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

El seguimiento de las cinéticas se realizó determinando la concentración de glutamato. Como se puede ver en la figura 5.2, en la reacción donde se adicionó el EDTA, la actividad de

la GS se detuvo dado que las lecturas de glutamina y glutamato fueron prácticamente constantes después de la adición del agente quelante.

Existen otros métodos para inactivar la enzima GS tales como el calentamiento y la oxidación de ciertos aminoácidos que intervienen en la actividad enzimática catalizada por FeCl_3 , sin embargo, presentan algunos inconvenientes. Por ejemplo, en el caso de la inactivación por calor, el aminoácido Gln es muy lábil a altas temperaturas y puede descomponerse liberando amonio, haciendo prácticamente imposible el monitoreo por análisis de Gln y amonio.

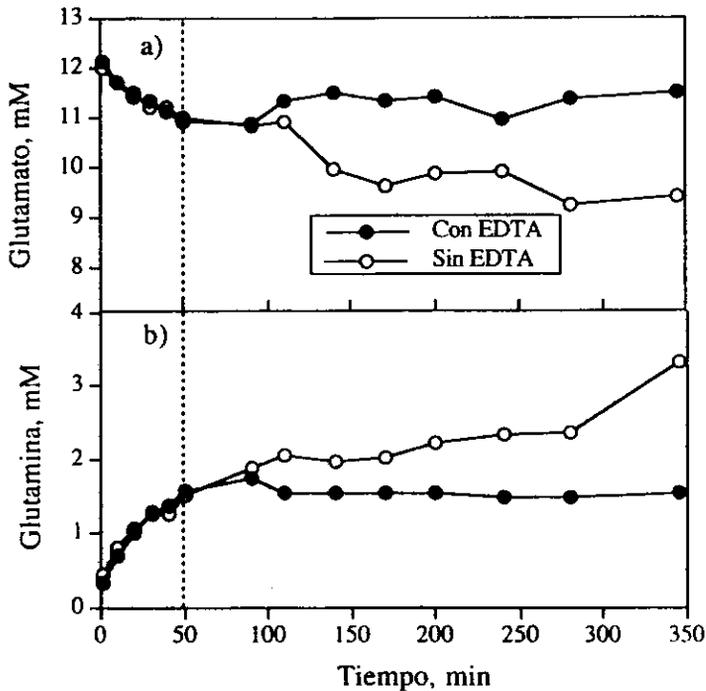


Figura 5.2.- Efecto inhibitorio del EDTA en la reacción catalizada por la glutamino sintetasa al secuestrar los iones Mg^{+2} . La línea vertical punteada indica el tiempo en que se adicionó el EDTA.

La inactivación de la enzima por FeCl_3 , esta asociada con la modificación covalente de al menos dos aminoácidos His y Arg, localizados en el sitio de unión a metales n_2 . Sin embargo el FeCl_3 puede catalizar la oxidación no solo de la enzima, sino también de otros componentes del medio de cultivo e interferir en su análisis posterior.

5.3 Cinéticas de la glutamino sintetasa en medio de cultivo DMEM

Para probar si el sistema enzimático funcionaba en el medio de cultivo DMEM, se decidió utilizar 1 unidad/ml de enzima, 60 mM de $MgCl_2$, 15 mM de ATP y 12.5 mM de glutamato de sodio para degradar 5 mM de NH_4Cl . Se realizaron dos reacciones en medio DMEM, una de las cuales se suplementó con 10 % de SFB, como se realiza en la gran mayoría de cultivos de células de eucariotes superiores, para evaluar si la presencia del suero tiene alguna influencia sobre la enzima.

Al inicio se tomaron muestras cada 15 minutos para poder determinar las velocidades iniciales y posteriormente a tiempos mas largos para verificar si la reacción continuaba. Las muestras se colocaron en tubos de 1.5 ml con tapón de rosca y se congelaron instantáneamente en nitrógeno liquido, para posteriormente evaluar la concentración de glutamina y glutamato. El consumo de amonio se infirió por el incremento en la concentración de glutamina.

Como se muestra en la **tabla 5.2**, la velocidad inicial de las reacciones de la glutamino sintetasa en medio de cultivo DMEM con y sin suero fue menor a la velocidad inicial en buffer imidazol.

Tabla 5.2.- Comparación de la actividad de la enzima glutamino sintetasa en buffer imidazol y medio de cultivo DMEM con y sin SFB

Tipo de reacción	Velocidad inicial (mM/min)	% respecto a la velocidad en buffer
Buffer	0.0214	100
DMEM	0.0060	28
DMEM (10% SFB)	0.0086	40

Se puede apreciar en la **figura 5.3** que las reacciones realizadas en el medio con y sin SFB tuvieron aproximadamente la misma velocidad inicial de consumo de glutamato. Sin embargo, ésta se mantiene lineal por más tiempo en el medio con SFB; esto quizá se deba a que el suero estabiliza a la enzima. En estas cinéticas la concentración de amonio se infirió del incremento en la concentración de glutamina, ya que hasta este momento todavía no se había implementado una técnica confiable para cuantificar amonio a concentraciones menores de 5 mM.

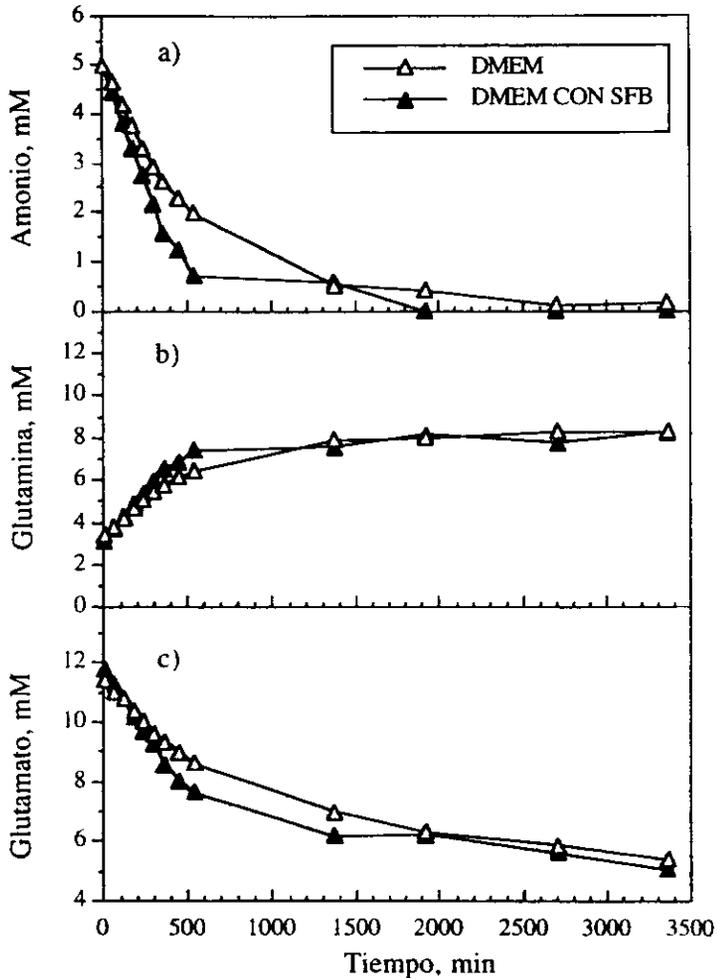


Figura 5.3.- Comparación de las cinéticas de la enzima glutamino sintetasa en medio de cultivo DMEM para hibridomas con y sin SFB. a) consumo de amonio. b) generación de glutamina y c) consumo de glutamato. La reacción fué a 37 °C con 1 unidad/ml de enzima, 60 mM de $MgCl_2$, 15 mM de ATP, 12.5 mM de glutamato de sodio y 5 mM de NH_4Cl .

Es importante observar que el sistema enzimático funciona en medio con y sin suero, ya que actualmente es práctica común utilizar medios a base de suero o con sustitutos del mismo en los cultivos de células de eucariotes superiores. También es importante observar que la

concentración de amonio casi llega a cero, y la concentración de Gln aumenta y se mantiene asintótica en aproximadamente 8 mM, mientras que la concentración de glutamato continua disminuyendo. Esto se debe a que la Gln del medio sufre descomposición química y genera piroglutamato y amonio. Este último reacciona con el glutamato en presencia del sistema GS para formar nuevamente glutamina. La concentración de glutamina alcanza un valor máximo cuando el amonio se consume totalmente y el consumo de glutamato continúa mientras exista o se genere amonio. Esto es importante pues gran parte del amonio generado en los cultivos de células eucariotes superiores proviene de la descomposición química de Gln y la utilización del sistema GS puede regenerarla.

5.4 Cinética de la glutamato deshidrogenasa en medio de cultivo DMEM

Para probar si el sistema enzimático de la glutamato deshidrogenasa (GDH) funcionaba en el medio de cultivo DMEM con 10% de SFB, se realizaron cinéticas con 0.12, 0.09, 0.07 unidades/ml de enzima GDH (1 unidad definida como la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de α -cetoglutarato a L-glutamato por minuto a pH 7.3 y 25 °C) en presencia de 12.5 mM de α -cetoglutarato, 15 mM de NADH y 3.5 mM de NH_4Cl .

Se tomaron muestras cada hora con la finalidad de poder determinar las velocidades iniciales de consumo de amonio y posteriormente cada 12 horas para realizar el seguimiento de las cinéticas. Las velocidades de consumo de amonio iniciales fueron de 0.0042, 0.0037 y 0.0028 mM/min para las concentraciones de enzima de 0.12, 0.09 y 0.07 unidades/ml respectivamente. Como se puede ver en la **figura 5.4**, con una concentración de enzima de 0.12 unidades/ml se logró eliminar 3.5 mM de amonio en aproximadamente 25 horas, la velocidad de consumo de amonio fue lineal en las primeras 7 horas y posteriormente adquirió un comportamiento asintótico. Las concentraciones de α -cetoglutarato y glutamato se infirieron a partir del consumo de amonio.

Es importante hacer notar que el sistema GDH funciona en el medio de cultivo DMEM en presencia de 10% de SFB. Este sistema transforma el amonio y α -cetoglutarato en glutamato, el cual no es tóxico para los hibridomas.

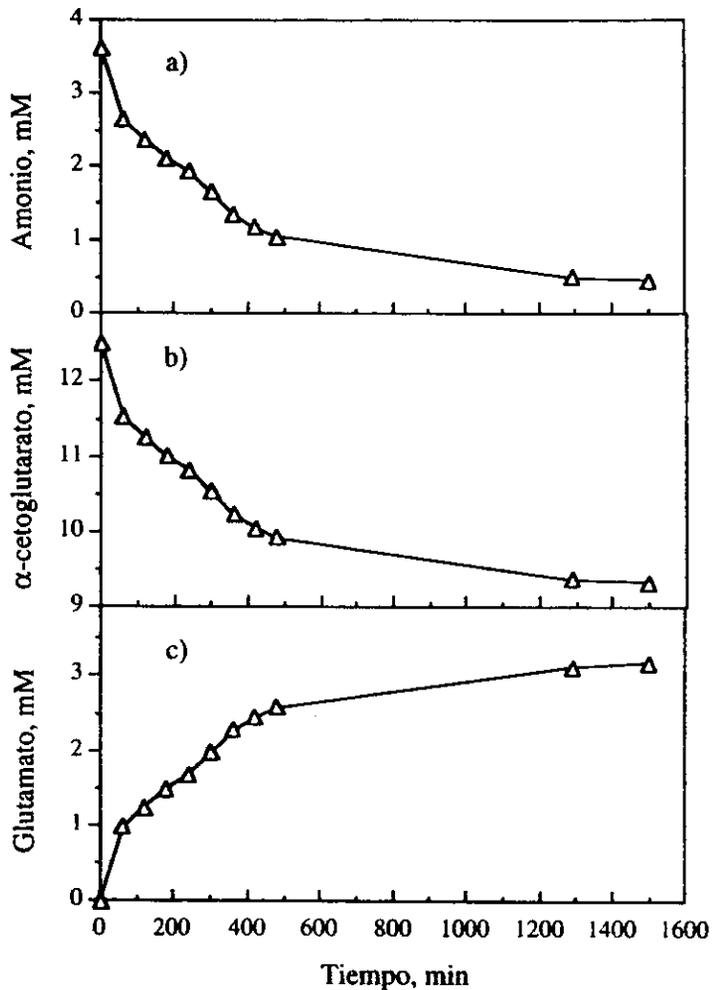


Figura 5.4.- Cinética del proceso de eliminación de amonio con la enzima glutamato deshidrogenasa en medio de cultivo DMEM con SFB. a) consumo de amonio, b) consumo de α -cetoglutarato y c) generación de glutamato. La reacción fué a 37 °C, pH de 7.2, 0.12 unidades/ml de enzima, 12.5 mM de α -cetoglutarato, 15 mM de NADH y 3.5 mM de NH_4Cl . Las concentraciones de α -cetoglutarato y glutamato se infirieron a partir del consumo de amonio.

5.5 Estabilidad del ATP en medio de cultivo DMEM

Se evaluó la estabilidad del ATP en el medio de cultivo DMEM a 37 °C y pH 7.2, con base en la cantidad de ortofosfato generado por su descomposición química con el tiempo. El

ATP puede descomponerse en ADP y ortofosfato, o bien generar AMP y pirofosfato. El ADP formado, a su vez, puede descomponerse en AMP y ortofosfato. Sin embargo, los primeros productos son los que se generan primero, debido a que la excisión del primer grupo fosfato termodinámicamente requiere menor energía. Por lo tanto, cuantificando el ortofosfato generado permite lograr una muy buena aproximación de el ATP que se ha hidrolizado.

En la figura 5.5 se presentan las cinéticas de generación de fosfato por descomposición de 15 mM de ATP en medio DMEM con y sin SFB; puede observarse que la presencia del suero favorece la hidrólisis del ATP, esto quizá se deba a la presencia de algunas fosfatasas.

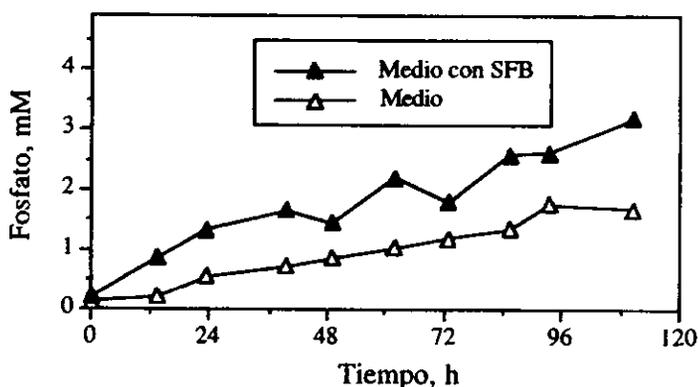


Figura 5.5.- Cinéticas de generación de fosfatos por descomposición de 15 mM de ATP en medio DMEM.

Estos resultados contrastan con los de la figura 5.3, donde la presencia del SFB es favorable porque mantiene la velocidad de consumo de amonio lineal por más tiempo en las cinéticas con la GS en medio de cultivo, mientras que por otro lado, su presencia disminuye la estabilidad del ATP en el medio, como se puede apreciar en la figura 5.4.

En la figura 5.6 se presentan las cinéticas de descomposición de 15 mM de ATP. La concentración de ATP remanente se infirió por la concentración de ortofosfato generado. Aunque en la figura se observa que la cinética de descomposición parece de orden cero, los datos se ajustan mejor a un modelo de primer orden:

$$\frac{d[\text{ATP}]}{dt} = -k [\text{ATP}] \quad (17)$$

donde k es la constante de primer orden.

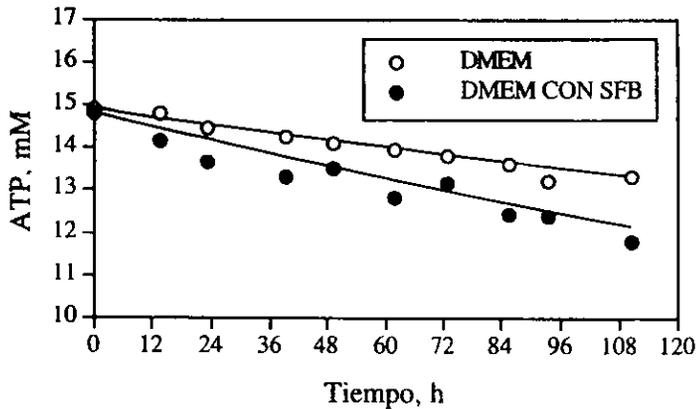


Figura 5.6.- Cinéticas de hidrólisis no enzimática de ATP, inferidas por la generación de ortofosfato.

La cinética de hidrólisis del ATP en medio de cultivo en ausencia de enzimas exógenas tiene una k de 0.00109 h^{-1} y la de medio con suero de 0.00179 h^{-1} . La presencia del SFB aumenta el valor de la constante de primer orden un 64 %, lo cual indica que el ATP se descompone más rápidamente por la presencia del suero, esto quizá se deba a la presencia de algunas fosfatasas en el SFB.

5.6 Estabilidad de la glutamina en medio DMEM

Se determinó la estabilidad de la Gln y la influencia del SFB sobre ésta, en medio de cultivo DMEM a 37°C y pH 7.2, colocando en la incubadora de CO_2 frascos T de 75 cm^2 conteniendo 30 ml de medio DMEM con una concentración de 21 mM de Gln inicial y monitoreando su concentración a diferentes tiempos.

Como puede observarse en la figura 5.7 en el panel a) el perfil de descomposición de Gln en medio DMEM con y sin SFB es muy similar, siendo ligeramente mayor para el medio con suero. La generación de amonio inferido de la desaparición de Gln, panel b), es también ligeramente mayor en presencia del SFB. En el panel c) se determinaron las constantes de descomposición de Gln en medio DMEM con y sin suero por ajuste de mínimos cuadrados.

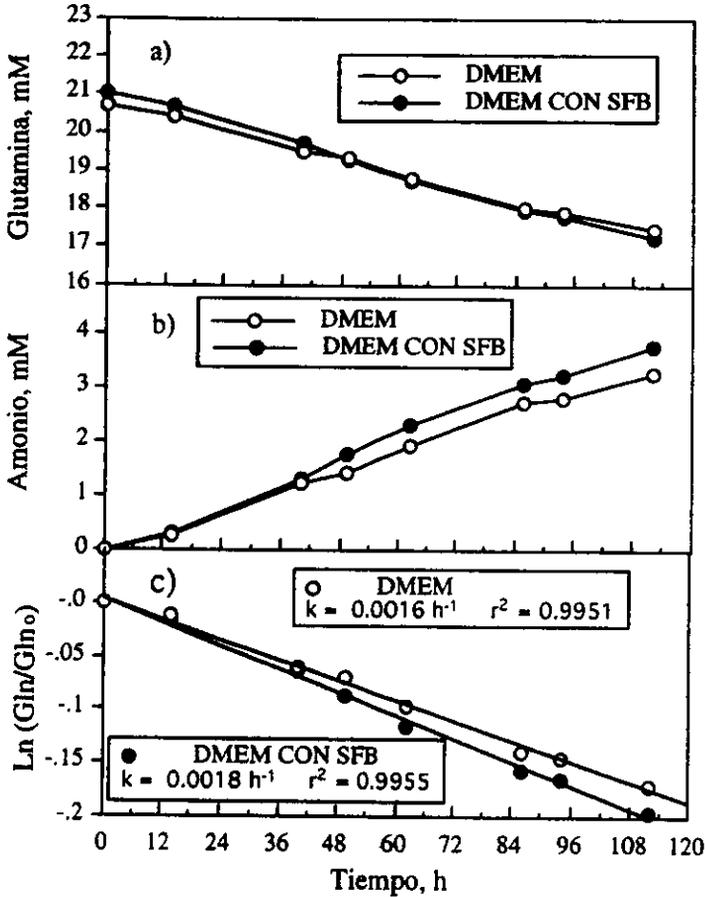


Figura 5.7.- Cinéticas de descomposición espontánea de glutamina en medio de cultivo DMEM. a) Descomposición de glutamina, b) Generación de amonio, c) Obtención de las constantes de descomposición por ajuste de mínimos cuadrados.

La constante de descomposición de la Gln en medio DMEM reportado por Ozturk y Palsson (1990) a pH 7.2 y 37 °C es de $1.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, mismo valor obtenido en el experimento para determinar la estabilidad de la Gln en medio de cultivo DMEM sin suero. El valor de la constante de descomposición espontánea de Gln determinada en medio con SFB fue 12.5 % mayor que la constante determinada en medio sin suero. Algunos autores consideran que la concentración de SFB tiene influencia sobre la velocidad de la reacción de descomposición espontánea de Gln (Lin y Agrawal, 1988). Sin embargo existen reportes en que el suero no debe afectar la constante de descomposición de glutamina, la cual solo depende del pH, fuerza

iónica, temperatura y composición del medio (Ozturk y Palsson, 1990). El efecto de la concentración de SFB sobre la constante de descomposición espontánea de Gln quizá se deba a la presencia de glutaminasas en el suero y su presencia sea un indicativo de un mal procedimiento de obtención del suero.

5.7 Formulación de un medio de baja osmolaridad.

Con base en los resultados anteriores, se verificó que efectivamente era factible eliminar amonio del medio de cultivo DMEM por el sistema enzimático de la glutamino sintetasa. Sin embargo la incorporación de los reactivos del sistema enzimático al medio de cultivo incrementa la osmolaridad a niveles que son inhibitorios para el crecimiento celular afectando la velocidad específica de crecimiento y las velocidades metabólicas de las células. Ozturk y Palsson (1990) realizaron estudios sobre el efecto del incremento de la osmolaridad en hibridomas; tales efectos se resumen en la tabla **tabla 5.3**.

Tabla 5.3.- Efecto del incremento de osmolaridad del medio sobre velocidades específicas de crecimiento y metabólicas. Las velocidades metabólicas están en $\mu\text{mol}/10^6$ células h (Ozturk y Palsson, 1990).

Osmolaridad mOsm	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)	Velocidad de muerte (h ⁻¹)	Velocidad de utilización de glutamina	Velocidad de producción de amonio	Y _{NH₄⁺/Gln} (mol/mol)
290	0.040	0.003	0.047	0.028	0.6
362	0.033	0.004	0.061	0.040	0.64
398	0.028	0.006	0.087	0.054	0.62
435	0.024	0.008	0.104	0.069	0.66

Por lo tanto, el siguiente paso fue la formulación de un medio de cultivo de baja osmolaridad, el cual se preparó de acuerdo a la composición de medio DMEM pero libre de NaCl (6.4 g/l), ya que este componente contribuye significativamente a la osmolaridad total del medio. De esta manera se pueden adicionar los reactivos del sistema enzimático y posteriormente ajustar la osmolaridad con una solución de NaCl concentrada. Una vez preparado el medio, se procedió a determinar cual era el incremento en osmolaridad para cada uno de los reactivos utilizados en el sistema enzimático. Se midió la osmolaridad de cada uno de los medios formulados que se especifican en la **tabla 5.4**.

Tabla 5.4.- Diferentes medios formulados con medio DMEM comercial y medio preparado (MP) con 15 mM de ATP, 6.25 mM de glutamato, 25 mM de MgCl₂ y 1 unidad/ml de enzima. El MP tiene la misma composición del DMEM pero sin NaCl.

Tipo de medio.	Descripción.
1	DMEM con ATP, Glu, MgCl ₂ , Enzima.
2	DMEM con ATP, Glu, MgCl ₂ .
3	DMEM.
4	Medio preparado (MP) + NaCl.
5	MP con ATP, Glu, MgCl ₂ , Enzima.
6	MP con ATP, Glu, MgCl ₂ .
7	MP con ATP.
8	MP con MgCl ₂ .
9	MP con Glu.
10	MP con Enzima.
11	MP sin suero fetal bovino.

En la **figura 5.8** se compara la osmolaridad de cada uno de los medios formulados con respecto a la composición de DMEM sin NaCl.

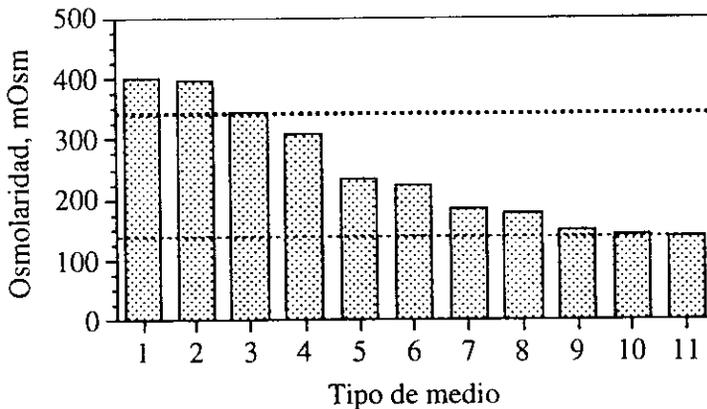


Figura 5.8.- Osmolaridad de diferentes medios formulados. Las líneas punteadas determinan la diferencia de osmolaridad por la presencia de NaCl. Los números en las abscisas corresponden al tipo de medio indicado en la tabla 5.4

En la **figura 5.9** se compara el incremento de osmolaridad por la adición de los diferentes reactivos del sistema GS en las concentraciones siguientes: enzima 1U/ml, glutamato 6.25 mM, MgCl₂ 25 mM y ATP 15 mM.

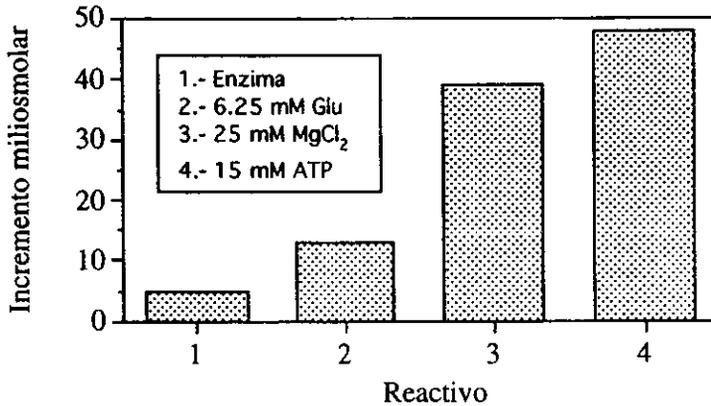


Figura 5.9- Incremento de osmolaridad por adición de los diferentes reactivos del sistema GS. Los números en las abscisas corresponden al tipo de reactivo.

De lo anterior podemos establecer las siguientes comparaciones que se resumen en la tabla 5.5.

Tabla 5.5.- Comparación del incremento de osmolaridad real e ideal de cada uno de los componentes del sistema enzimático de la glutamino sintetasa.

Componente	incremento ideal de osmolaridad (mOsm)	incremento real de osmolaridad (mOsm)	incremento real/ideal
25 mM MgCl ₂	75	39	0.52
15 mM ATP	75	48	0.64
6.25 mM Glutamato de Na	12.5	13	1.04
1 unidad/ml. Enzima	-	5	-
10% SFB	-	0	-

El "incremento de osmolaridad ideal" se refiere al incremento de osmolaridad que se esperaría al disolver cada componente en el medio de cultivo, considerando que éste se disociaría completamente en los iones que lo forman dando el incremento de osmolaridad correspondiente. Por ejemplo, el MgCl₂ idealmente contribuiría a un incremento de osmolaridad igual a tres veces su concentración molar al poderse disociar en tres iones. Sin embargo, de la relación de incremento real/ideal que idealmente debería ser 1 podemos determinar que se comporta en el medio como:

$$3 \cdot (0.52) = 1.56 \text{ iones}$$

Este comportamiento se rige por el valor de la constante de ionización del $MgCl_2$ la cual depende de la temperatura y establece la relación de disociación de los iones que constituyen esta sal. El comportamiento no ideal se debe a la fuerza iónica del medio de cultivo ocasionando efectos interiónicos, ya que la atracción mutua de iones con carga contraria asegura un comportamiento no ideal de todas las disoluciones de electrolitos, excepto las disoluciones extremadamente diluidas (Morris, 1993). De igual manera para el ATP, el cual se encuentra como sal tetrasódica, en teoría se disociaría en cinco iones, por lo tanto se comporta en el medio como:

$$5 \cdot (0.64) = 3.2 \text{ iones}$$

En el caso del glutamato de sodio realmente se comporta como dos iones en el medio de cultivo.

Esta determinación permitió que al adicionar los reactivos del sistema enzimático al medio libre de NaCl se facilitara ajustar la osmolaridad con una solución de NaCl 10x. Hasta este punto, se decidió probar el sistema enzimático en el medio de cultivo formulado ajustando la osmolaridad a un valor cercano a 340 mOsm. Para ello se realizaron cultivos por lote de hibridomas en frascos de 75 cm² y se presentaron problemas de muerte celular. Por lo que se decidió determinar si alguno de los componentes del sistema enzimático tanto de la glutamino sintetasa como de la glutamato deshidrogenasa, resultaban tóxicos para las células y se decidió evaluar por separado el efecto de cada uno de estos componentes.

5.8 Efecto de la concentración del $MgCl_2$ sobre el crecimiento celular.

Se evaluó el efecto que presenta el $MgCl_2$ a varias concentraciones sobre la velocidad específica de crecimiento. Para esto se prepararon diferentes formulaciones conteniendo 25, 10 y 5 mM de $MgCl_2$. Asimismo, se comparó el crecimiento de las células en el medio preparado con el medio DMEM comercial que normalmente se utiliza para el cultivo de esta línea.

El crecimiento de hibridomas en el medio preparado fue muy similar al crecimiento observado en el medio DMEM comercial, por tal razón, las variaciones observadas corresponden al efecto del $MgCl_2$ y no a diferencias notables en la composición del medio preparado.

Puede observarse en la **figura 5.10** que el $MgCl_2$ no afecta de manera negativa el crecimiento celular. Por el contrario, disminuye el tiempo lag del crecimiento, y tiene un ligero incremento sobre la velocidad específica de crecimiento; como puede apreciarse en la

figura 5.11, esto podría deberse a que el Mg^{2+} es necesario para la actividad de muchas enzimas celulares.

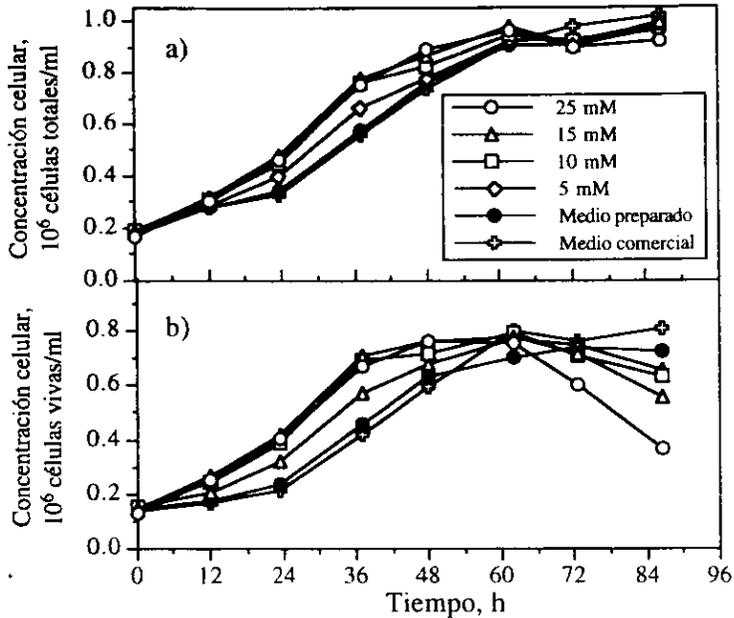


Figura 5.10.- Cinéticas de crecimiento de hibridomas a diferentes concentraciones de $MgCl_2$. a) Células totales, b) Células viables.

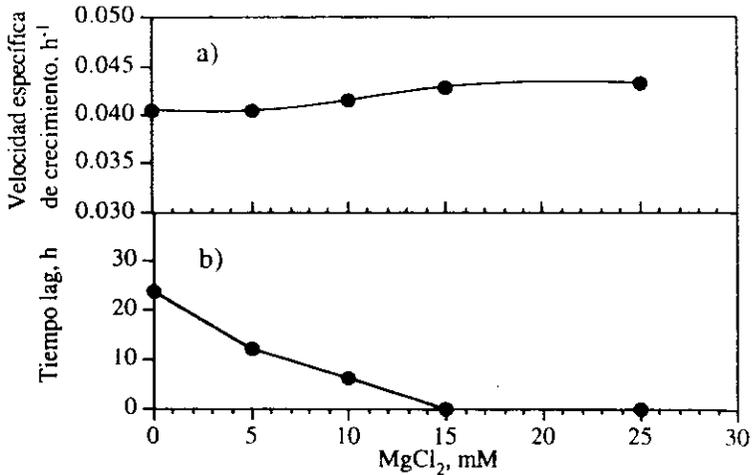


Figura 5.11.- Efecto de la concentración del $MgCl_2$ sobre la velocidad específica de crecimiento y tiempo lag en cultivos de hibridomas.

5.9 Efecto de la concentración del glutamato sobre el crecimiento celular.

Se evaluó el efecto de la concentración del glutamato de sodio sobre la velocidad específica de crecimiento. Se prepararon diferentes formulaciones de medio de cultivo conteniendo 12.5, 6.25 y 3 mM de glutamato de sodio.

Como se observa en la **figura 5.12**, al aumentar la concentración de glutamato de sodio en el cultivo de células de hibridoma se obtiene una ligera disminución en la velocidad específica de crecimiento.

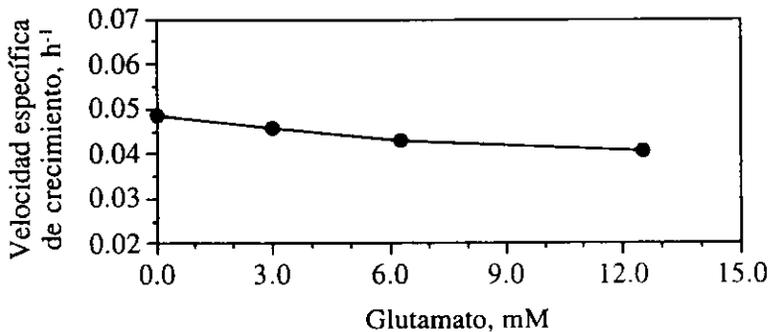


Figura 5.12.- Efecto de la concentración de glutamato de sodio sobre la velocidad específica de crecimiento de hibridomas.

5.10 Efecto de la concentración del ATP sobre el crecimiento celular.

Preliminarmente se realizaron cultivos de hibridomas en frascos T de 25 cm², en los cuales se adicionó ATP "grado cultivo celular" a concentraciones de 15, 7.5, 3.25 mM. En estos cultivos no se observó crecimiento celular y después de 12 horas la viabilidad disminuyó notablemente.

Solo a concentraciones de ATP menores a 1 mM, el número de células totales aumentó en los cultivos por lote realizados en frascos T de 25 cm². Para realizar un estudio más completo, se cultivaron hibridomas en frascos T de 75 cm² para disponer de un mayor volumen en las muestras y realizar cuentas celulares en el contador Coulter. Se utilizó medio DMEM comercial, puesto que a estas concentraciones de ATP, el aumento de osmolaridad no tiene un efecto determinante para ocasionar inhibición del crecimiento. El ATP se dosificó en pulsos para disminuir su efecto sobre las células, cada pulso aplicado en un periodo de tiempo de 12 h. La concentración de ATP en los pulsos en cada cultivo fue de 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM

con un total de 5 pulsos, para obtener concentraciones finales de 0.5, 1.25, 2.5 y 5 mM en cada cultivo respectivamente. A pesar de la dosificación del ATP en pulsos, existió inhibición de crecimiento y el número de células viables solo aumentó en el cultivo con pulsos de 0.1 mM; como se puede observar en la figura 5.13.

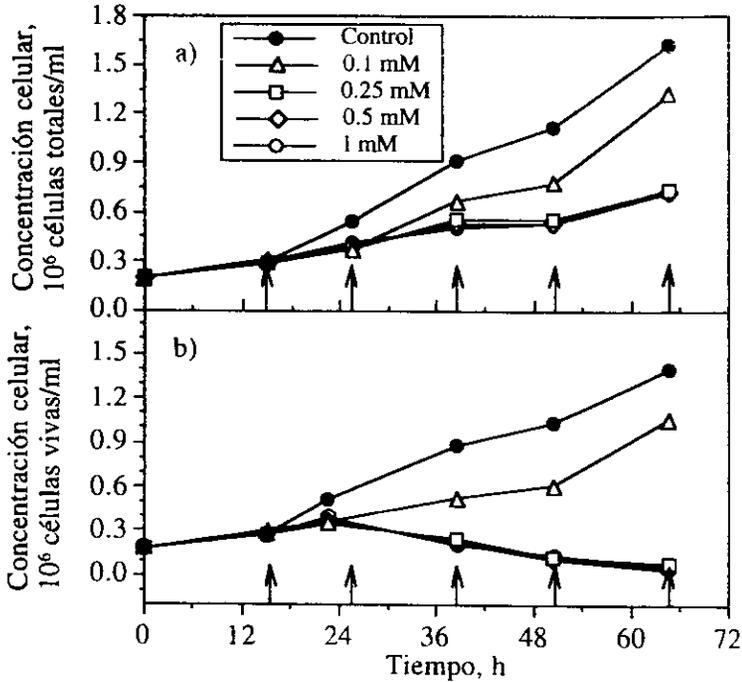


Figura 5.13.- Cinéticas de crecimiento de hibridomas con dosificación de pulsos de ATP a diferentes concentraciones. Se dosificó 0.5, 1.25, 2.5 y 5 mM de ATP en 5 pulsos. a) Células totales. b) Células viables.

En los cultivos donde los pulsos fueron de 0.25, 0.5 y 1 mM aumentó el número de células totales, pero aún por abajo del cultivo control en el que no se adicionó ATP. El número de células viables fue siempre menor después del primer pulso. El único cultivo donde aumentó el número de células viables, fue en el que se dosificó 0.5 mM de ATP en 5 pulsos de 0.1 mM durante la fase exponencial de crecimiento. Esta concentración de ATP no es suficiente para eliminar la concentración de amonio promedio en cultivos por lote de células de hibridoma, la cual es de aproximadamente 5 mM. El crecimiento se ve afectado incluso de una manera más drástica que con la misma concentración de amonio.

De lo anterior, se puede concluir que el uso del sistema enzimático de la glutamino sintetasa para eliminar amonio en los cultivos de ésta línea particular de hibridomas utilizada, se ve limitado por el efecto inhibitorio del ATP sobre el crecimiento celular.

El comportamiento de las cinéticas de crecimiento con ATP-Mg y ATP fueron idénticas, ya que al comparar su efecto sobre la velocidad específica de crecimiento aparente (μ_{ap}), éste fue el mismo, como se puede observar en la **figura 5.15**.

Un valor negativo de la velocidad específica de crecimiento aparente significa que la velocidad específica de crecimiento real (μ_r) es menor que la constante de muerte (k_d), de acuerdo a:

$$\mu_{ap} = \mu_r - k_d \quad (18)$$

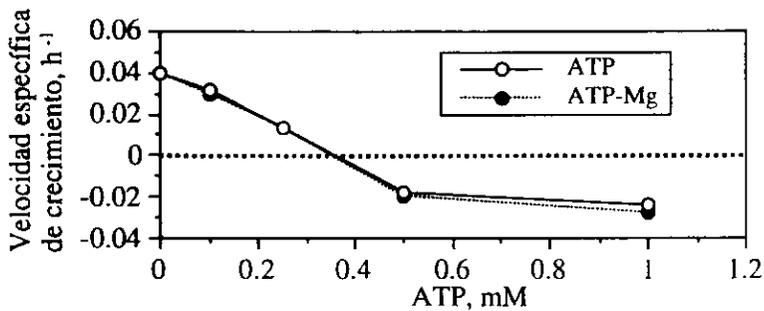


Figura 5.15.- Efecto de la concentración del ATP y ATP-Mg sobre la velocidad específica de crecimiento de hibridomas.

5.12 Efecto de la concentración de ATP extracelular sobre el crecimiento en células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf-9)

Con la finalidad de verificar si otras líneas celulares son sensibles a la presencia de ATP extracelular, se realizaron dos cultivos de células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) en frascos T de 75 cm², a uno de ellos se le dió un pulso de 5 mM de ATP a las 62 h del cultivo y el otro fue el control .

Como se puede apreciar en la **figura 5.16** la presencia de 5 mM de ATP extracelular mostró tener solamente un ligero efecto inhibitorio sobre el crecimiento, el cual se ve reflejado en la disminución de la concentración celular máxima.

No se realizaron cinéticas de crecimiento con el sistema enzimático GS y GDH en células de insecto Sf-9, pues al realizar la determinación de amonio en un cultivo por lote, la concentración de amonio fue cero. Sin embargo, los resultados de la **figura 5.16** comprueban que existen líneas celulares tolerantes a ATP y que por lo tanto la estrategia enzimática de

eliminación de amonio sigue siendo una posibilidad viable para otras líneas celulares. Asimismo, para líneas celulares tolerantes al amonio, como pueden ser algunas células de insecto, la eliminación del amonio sigue siendo importante ya que puede afectar aspectos tan fundamentales como lo es el patrón de glicosilación de proteínas (Dyken and Sambanis., 1994).

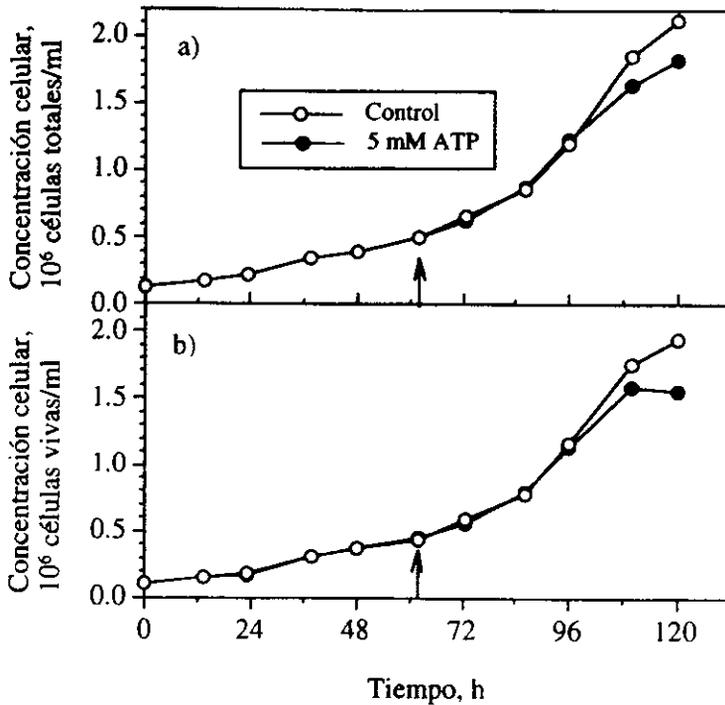


Figura 5.16.- Cinética de crecimiento de células de insecto con pulso de 5 mM de ATP. La flecha indica el tiempo del pulso. a) Células totales, b) Células viables

5.13 Efecto del α -cetoglutarato en cultivo de hibridomas.

Se determinó la existencia de algún efecto inhibitorio o citotóxico de los reactivos del sistema enzimático de la glutamato deshidrogenasa en cultivos de hibridomas, siendo éste un sistema enzimático atractivo considerando que existe el antecedente de eliminación de amonio con este sistema en el medio de cultivo en embriones por Lane y Gardner (1995).

Se realizó un cultivo con 2 mM de α -cetoglutarato y uno control. Como puede observarse en la **figura 5.17**, tanto el número de células totales como viables fue muy similar en estos cultivos, con lo cual podemos establecer que el α -cetoglutarato, al menos a ésta concentración, no es inhibitorio ni tóxico para los hibridomas.

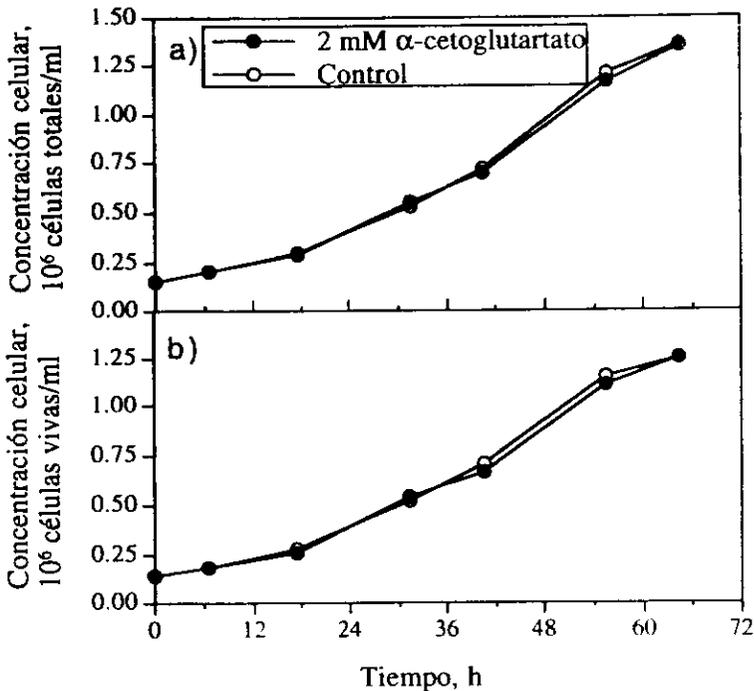


Figura 5.17.- Cinéticas de crecimiento de hibridomas con 2 mM de α -cetoglutarato inicial. a) Células totales, b) Células viables.

5.14 Efecto de la presencia del NADH en el cultivo de hibridomas.

Para estudiar el efecto del NADH sobre las células de hibridoma, se realizó un cultivo al cual se le adicionó suficiente NADH para dar una concentración final de 2 mM.

Como puede observarse en la **figura 5.18**, la presencia de 2 mM de NADH resultó tóxico para las células de hibridomas. La concentración de células totales prácticamente se mantuvo constante desde el momento de inocular el cultivo y la concentración de células viables

disminuyó considerablemente, llegando a cero aproximadamente a las 51 h. No existen reportes sobre el efecto tóxico en células por NADH extracelular.

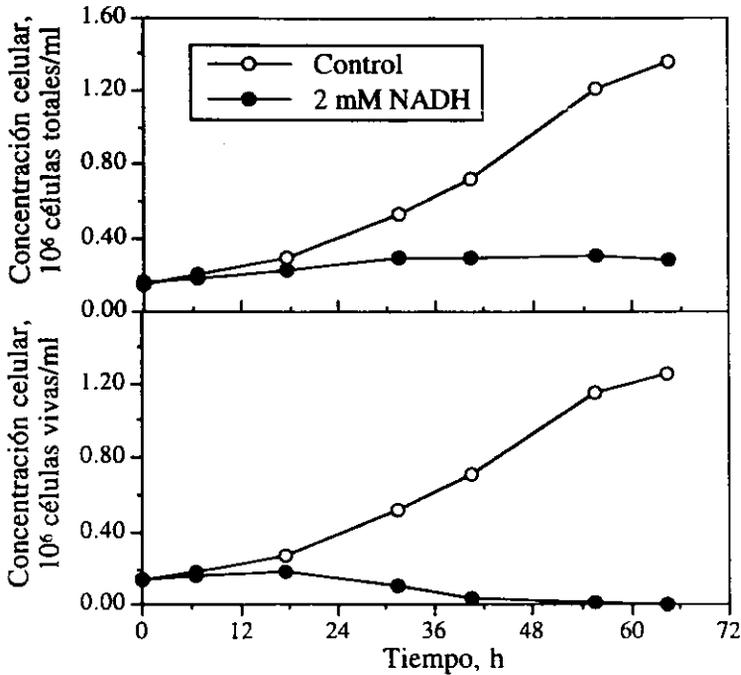


Figura 5.18.- Cinéticas de crecimiento de hibridomas en presencia de 2 mM de NADH inicial. a) Células totales. b) Células viables.

5.15 Efecto de la presencia del NADH extracelular en cultivo de células de insecto Sf-9.

Se evaluó el efecto de la presencia de 5 mM de NADH adicionado al inicio del cultivo de células de insecto Sf-9. Como se puede observar en la **figura 5.19 a)**, al comparar la concentración de células totales de éste cultivo con el control, podemos establecer que la presencia del NADH tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular, aunque mucho menor que para los cultivos de hibridomas.

La concentración de células viables del cultivo con NADH, **figura 5.19 b)**, fue muy similar a la concentración de células totales de este mismo cultivo, **figura 5.19 a)**, esto nos indica que aunque la presencia del NADH extracelular inhibe el crecimiento, no produce

muerte celular, a diferencia de los cultivos de hibridomas donde la viabilidad disminuye significativamente.

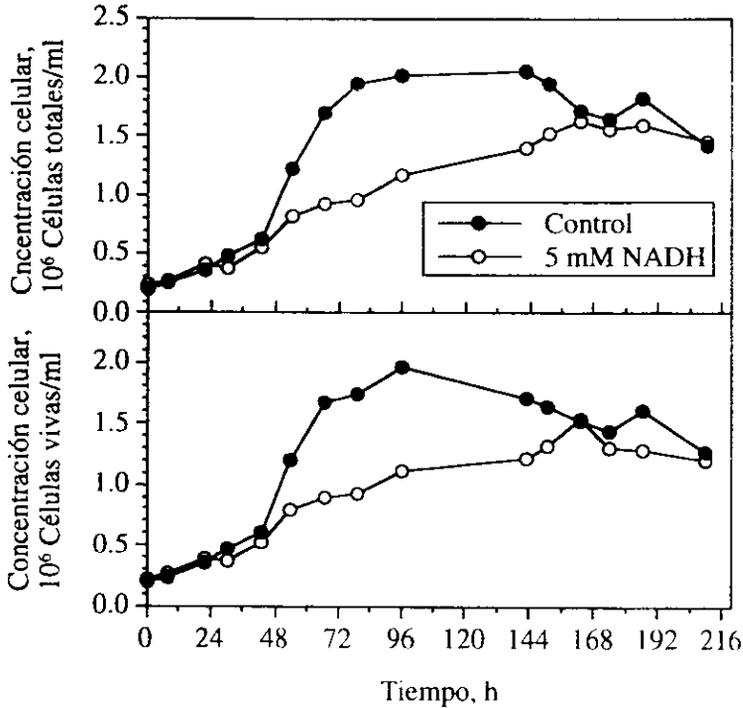


Figura 5.19.- Cinéticas de crecimiento de células de insecto Sf-9 en presencia de 5 mM de NADH inicial. a) Células totales, b) Células viables.

5.16 Utilización del sistema enzimático GS con dosificación de ATP en pulsos.

Para determinar si la presencia del sistema enzimático podría disminuir el efecto tóxico del ATP en los cultivos de hibridomas, debido a que la enzima GS puede utilizar el ATP para la reacción de síntesis de Gln y eliminación de amonio, y dado que existen reportes en los que los cambios en la concentración de calcio intracelular y quizá la toxicidad del ADP es menor a la del ATP, siendo el orden: ATP > ADP > AMP > Adenosina (Vandewalle y col., 1994), se realizaron cultivos por lote en los que se adicionaron los reactivos del sistema enzimático (1 unidad/ml de enzima GS, 25 mM de MgCl₂ y 12.5 mM de glutamato de sodio). El ATP se dosificó en nueve pulsos de 0.05 y 0.1 mM durante la fase exponencial de crecimiento para dar un total de 0.45 y 0.9 mM.

El crecimiento celular en los cultivos donde se utilizó el sistema enzimático y se dosificó el ATP fue menor que en el cultivo control donde no se utilizó el sistema. Puede observarse en la figura 5.20 que la concentración tanto de células vivas como totales fue menor mientras mayor fue la concentración de ATP adicionado.

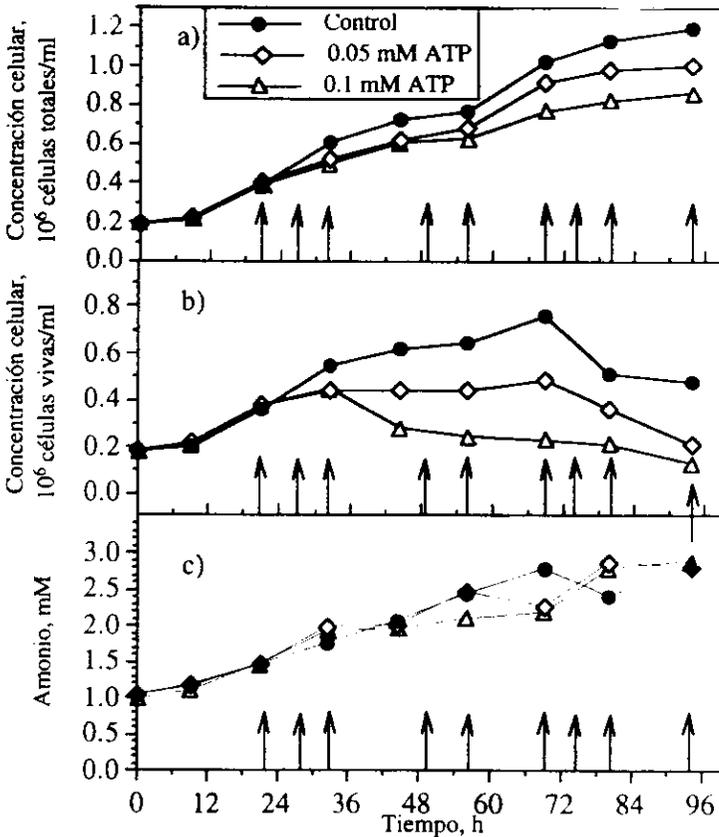


Figura 5.20.- Cinéticas de crecimiento de hibridomas y producción de amonio, en presencia del sistema enzimático GS con dosificación de la concentración del ATP mediante pulsos. a) Células totales, b) Células viables, c) Producción de amonio.

Esto nos indica que el efecto citotóxico del ATP existe aún en la presencia del sistema enzimático.

En la figura 5.20 c), se puede apreciar que la producción de amonio es muy similar para los cultivos con el sistema enzimático y el control, por lo tanto no existe una eliminación de

éste. Se ha reportado recientemente que el ATP se une a purinoreceptores P2z de la membrana citoplasmática de la mayoría de las células de mamíferos y ocasiona algunas perturbaciones como las siguientes :

- a) Abre canales iónicos asociados con estos purinoreceptores y permite la entrada inespecífica de iones y moléculas de bajo peso molecular al interior de la célula (Nagy y col.,1995)
- b) Induce apoptosis (muerte celular programada) en algunas líneas celulares la cual es controlada por las proteín-tirosin-quinasas (PTQ) cuya actividad es regulada fuertemente por proteín-tirosin-fosfatasas (PTF) (Bronte y col., 1996).
- c) Provoca despolarización de membrana plasmática (Falzoni y col., 1995).
- d) Incrementa la concentración de calcio citoplasmático (Gallinaro y col., 1995).
- e) Aumenta la permeabilidad de la membrana al NH_4^+ (Chen y col., 1994).

Está reportado que las células del sistema inmunológico expresan un receptor de la membrana plasmática para ATP extracelular P2z, el cual parece estar acoplado al poro de la membrana y se sugiere un posible papel para este en la respuesta inmune e inflamatoria (Di-Virgilio, 1995). También se cree que al ocurrir un daño necrótico, se libera ATP de la lisis celular y esto induce apoptosis a las células vecinas evitando que el daño necrótico avance.

5.17 Utilización del sistema enzimático GDH en cultivo de hibridomas.

Con la finalidad de analizar si el efecto tóxico del NADH disminuye por la presencia del sistema enzimático de la GDH, debido a que este sistema utiliza el NADH para transformar el amonio y el α -cetoglutarato a glutamato y pudiera dejar menos disponible el NADH para las células, se realizaron cultivos de hibridomas, a los cuales se les adicionaron los reactivos del sistema enzimático GDH para dar las siguientes concentraciones finales: 1 unidad/ml de enzima GDH, 2 mM de α -cetoglutarato y 2 mM de NADH.

Como puede observarse en la **figura 5.21**, el efecto tóxico del NADH en presencia del sistema enzimático no disminuyó con respecto al efecto del NADH sólo. La concentración de células totales permanece prácticamente constante y la de células viables disminuye drásticamente llegando a cero a las 51 h.

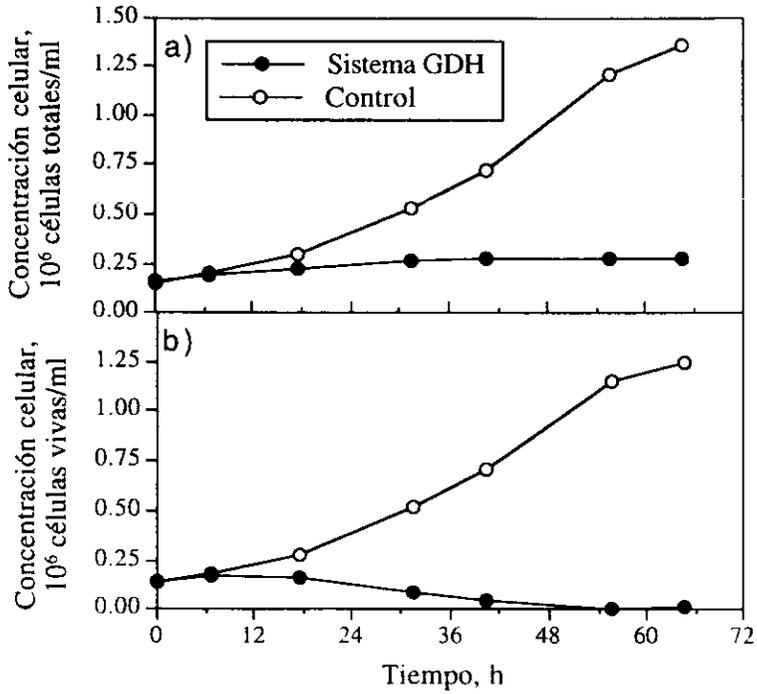


Figura 5.21.- Cinéticas de crecimiento de hibridomas en presencia del sistema enzimático GDH. 1 unidad/ml de enzima GDH, 2 mM de α -cetoglutarato, 2 mM de NADH. a) Células totales, b) Células viables.

CONCLUSIONES Y DIRECCIONES FUTURAS.

En este trabajo se estudió una alternativa novedosa para la eliminación del ion amonio del medio de cultivo de células de eucariotes superiores, utilizando dos métodos enzimáticos, el de la glutamino sintetasa y el de la glutamato deshidrogenasa.

El sistema enzimático de la glutamino sintetasa (1 unidad/ml de enzima, 60 mM de $MgCl_2$, 12.5 mM de glutamato de sodio y 15 mM de ATP) eliminó satisfactoriamente 5 mM de amonio adicionado al medio de cultivo DMEM libre de células en un tiempo de 24 h. Asimismo, el sistema de la glutamato deshidrogenasa (0.12 unidades/ml de enzima, 12.5 mM de α -cetoglutarato y 15 mM de NADH) eliminó 3.5 mM de amonio en aproximadamente 25 h. Esto nos indica que ambos sistemas se pueden utilizar para eliminar amonio en medios de cultivo tan complejos como los de células de eucariotes superiores. No obstante, al ser ensayados los sistemas en dos líneas de CES, se presentaron los siguientes problemas:

El ATP extracelular resultó tóxico para los hibridomas a concentraciones de 0.1 mM. A pesar de que existen reportes de que el sistema de la glutamato deshidrogenasa se ha utilizado exitosamente en eliminar amonio en medio de cultivo de embriones, el componente NADH también resultó tóxico para los hibridomas a concentraciones de 2 mM. Esto quizá sea por que los hibridomas no tengan una barrera protectora como en el caso de los embriones, en los cuales sus células están organizadas formando sistemas y órganos.

El ATP no resultó tóxico para las células de insecto Sf-9, ya que estas crecieron normalmente en concentraciones de 5 mM de este reactivo. El sistema de la glutamino sintetasa no se aplicó a esta línea celular, debido a que la concentración de amonio que generan, es prácticamente cero. Con lo anterior se demostró que si bien el sistema enzimático no puede generalizarse a cualquier tipo de célula, si existen cultivos particulares en que el ATP extracelular no presenta un efecto citotóxico, donde se pueda eliminar el amonio exitosamente.

El sistema enzimático de la glutamato deshidrogenasa presenta la ventaja potencial de que se puede acoplar con el sistema de la lactato deshidrogenasa para eliminar simultáneamente lactato y regenerar el cofactor NADH.

Las direcciones futuras del presente trabajo las podemos resumir en la búsqueda de líneas celulares productoras de amonio, en las que el ATP y NADH no sean tóxicos para poder aplicar los sistemas enzimáticos de la GS y GDH, así como establecer un sistema de regeneración de los cofactores para reducir los costos.

Bibliografia.

- Abell, L. M. and Villafranca, J. J. (1990). Effect of metal ions and adenylation state on the energetics of the *E. coli* glutamine synthetase reaction. In *Chemical aspects of enzyme biotechnology*, Baldwin T.O., Raushel, F. M. and Scott, A. I. Eds. Plenum Press, New York. Pp. 1-8.
- Bell, S. L., Bebbington, C., Scott, M. F., Wardell, J. N., Spier, R. E., Bushell, M. E. and Sander, P.G. (1995). Genetic engineering of hybridoma glutamine metabolism. *Enzyme Microbiol. Technol.* **17**: 98-106.
- Bell, S. L., Bushell, M. E., Scott, M. F., Wardell, J. N., Spier, R. E. and Sanders, P.G. (1992). Genetic modifications of hybridoma glutamine metabolism: physiological consequences. In: *Animal cell technology: developments, processes and products*. Spier, R. E., Griffiths, J. B. and Macdonal, C. Eds. Butterworth-Heinemann. pp. 180-182
- Bender, R. A., Janssen, K. A., Resnick, A. D., Blumenberg M., Foor F. and Magasanik B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J.Bacteriol.* 1001-1009.
- Bibila, T.A. and Robinson D. K. (1995). In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnol. Prog.* **11** (1):1-13
- Birch, J. R., Boraston, K. C., Metcalfe, H., Brown, M. E., Bebbington, C.R. and Field, R. P. (1994). Selecting and designing cell lines for improved physiological characteristics.. *Cytotechnol.* **15**:11-16.
- Bohmann, A., Pörtner, R. and Märkl, H. (1995). Performance of membrane-dialysis bioreactor with a radial-flow fixed bed for the cultivation of a hybridoma cell line. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **43**:772-780.
- Bols, N.C., Ganassin R.C., Tom, D.J. and Lee, L. E. J. (1995). Growth of fish cell lines in glutamine-free media. *Cytotechnol.* **16**: 159-166.
- Boraston, R., Thompson, P. W., Garland, S. and Birch, J. R. (1984). Growth and oxygen requirements of antibody producing mouse hybridoma cells in suspension culture. *Develop. Biol. Standard.* **55**: 103-11.
- Brand, K., von Hintzenstarn, J., Langer, K. and Fekl, W., (1987). Pathways of glutamine and glutamate metabolism in resting and proliferating rat thymocytes: Comparison between free and peptide-bound glutamine. *J. Cell Physiol.* **132**: 559-564.
- Bronte, V., Macino, B., Zambon, A., Rosato, A., Mandruzzato, S., Zanovello, P. and Collavo, D. (1996). Protein tyrosine kinases and phosphatases control apoptosis induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**(1):344-351.
- Bushell, M. E., Bell, S. L., Scott, M. F., Spier, R. E., Wardell, J. N. and Sanders, P. G. (1994). Enhancement of monoclonal antibody yield by hybridoma fed-batch culture, resulting in extended maintenance of viable cell population. *Biotechnol. Bioeng.* **44** (9): 1099-1106.

- Butler, M. and Christie, A. (1994). Adaptation of mammalian cells to non amoniagenic media *Cytotechnol.* **15**: 87-94.
- Canale, G. L., Maquieira, A. and Puchades, R. (1990). Enzymatic determination of ammonia in food by flow injection. *Analyst.* **115**(9): 1243-1246.
- Capiaumont, J., Legrand, C., Carbonell, D., Dousset, B., Belleville, F. and Nabet, P. (1995). Methods for reducing the ammonia in hybridoma cell cultures. *J. Biotechnol.* **39**: 49-58.
- Chang, Y. H. D., Grodzinsky, A. J. and Wang D. I. C. (1995 a). In-situ removal of ammonium and lactate through electrical means for hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 308-318.
- Chang, Y. H. D., Grodzinsky, A. J. and Wang, D. I. C. (1995 b). Nutrient enrichment and *in-situ* waste removal through electrical means for hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 319-326.
- Chen, J. R., Jamieson, G. P. and Wiley, J. S. (1994). Extracellular ATP increases NH_4^+ permeability in human lymphocytes by opening a P2Z purinoceptor operated ion channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**(3): 1511-1516.
- Christie, A. and Butler, M. J. (1994). Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *J. Biotechnol.* **37**(3): 277-290.
- Di-Virgilio, F. (1995). The P2Z purinoreceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol. Today.* **16**(11): 524.
- Doyle, C. and Butler, M. (1990). The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma. *J. Biotechnol.* **15**: 91-100.
- Duval, D., Demangel, C., Munier-Jolain, K., Miossec, S. and Geahel, I. (1991). Factor controlling cell proliferation and antibody production in mouse hybridoma cells. I. Influence of the amino acid supply. *Biotech. Bioeng.* **38**: 561-570.
- Dyken, J. J. and Sambanis, A. (1994). Ammonium selectively inhibits the regulated pathway of protein secretion in two endocrine cells. *Enzyme Microb. Technol.* **16**(2): 90-98.
- Falzone, S., Munerati, M., Ferrari, D., Spisani, S., Moretti, S. and Di-Virgilio, F. (1995). The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *J. Clin. Invest.* **95**(3): 1207-1016.
- Gallinaro, B. J., Reimer, W. J. and Dixon, S. J. (1995). Activation of protein kinase C inhibits ATP-induced (Ca_2^+)_i elevation in rat osteoblastic cells: selective effects on P2Y and P2U signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* **162**(3): 305-314.
- Gerhartz, W. (1990). *Enzymes in Industry: Production and applications*. Wolfgang Gerhartz Ed. New York, NY: VCH. table 32.
- González, R. P., Sánchez, N. S. and Gavilez, R. M. (1992). A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal. Biochem.* **200**: 235-238.

- Graf, H. and Schüegerl, K. (1991). Some aspects of hybridoma cell cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**(2): 165-175.
- Gu, K. F. and Chang T. M. S. (1987). Conversión of a-cetoglutarate into L-glutamic acid with urea as ammonium source using multienzyme systems and dextran-NAD⁺ immobilized by microencapsulation within artificial cells in a bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 363-368.
- Hecht, V., Bischoff, L. and Gerth, K. (1989). Hollow fiber supported gas membrane for *in situ* removal of ammonium during an antibiotic fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 1042-1050.
- Helmward, Z. (1993). *Handbook of enzyme inhibitors*. Revised and enlarged edition part A New York: VCH. Pp. 233-234.
- Higareda, A. E. (1994). Estrategias para optimizar la producción de anticuerpos monoclonales por cultivo de hibridomas en suspensión, tesis Maestría, Instituto de Biotecnología, U.N.A.M., Cuernavaca, México.
- Higareda, A. E., Possani, L. D. and Ramirez, O. T. (1993). Use of on-line culture redox potential and oxigen uptake rate measurements in advanced computerized nutrient feeding strategies for optimization of MAb production. Presentado en la "Annual Meeting of the American Institute of Chemical Engineers" St. Louis, MO, E.U.A., No. 104g., Nov. 1993.
- Hosoi, S., Mioh, H., Anzai, C., Sato, S. and Fujiyoshi, N. (1988). Establishment of Namalva cell lines which grow continuously in glutamine-free medium. *Cytotechnol.* **1**: 151-158.
- Iio, M., Moriyama, A. and Murakami, H. (1984). Effects on cell proliferation of metabolites produced by cultured cells and their removal from culture in defined media. In: Murakami et al. (Eds.), *Proceedings of the International Symposium on Growth and Differentiation of Cell in Defined Environment*. Fukuoka, Japan. 437-442.
- Jeong, Y. H. and Wang, S. S. (1995). Role of glutamine in hybridoma cell culture: Effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism. *Enzyme Microb. Technol.* **17**:47-55.
- Jeong, Y. H. and Wang, S.S. (1992). *In situ* removal of ammonium ions from hybridoma cell culture media: Selection of adsorbent. *J Biotechnol.* **6**: 341-346.
- Kaplan, A. (1965) Urea, nitrogen and urinary ammonia *Stand. Methods Clin. Chem.* **5**: 245-256.
- Kiba, N., Moriya, T. and Furusawa, M. (1992). Flow-injection determination of L-glutamate in serum with an immobilized glutamate-dehydrogenase reactor. *Anal. Chim. Acta.* **256**(2): 221-224.

- Kitoh, T., Kubota, M., Takimoto, T., Hashimoto, H., Shimizu, T., Sano, H., Akiyama, Y. and Mikawa, H. (1990). Metabolic basis for differential glutamine requirements of human leukemia cell lines. *J. Cell. Physiol.* **143**: 150-153.
- Krug, E., Zweibaum, A., Schultz-Holstege, C. and Keppler, D. (1984). D-Glucosamine-induced changes in nucleotide metabolism and growth of colon carcinoma cells in culture. *J. Biochem.* **217**: 701-708.
- Kurano, N., Leist, C., Messi, F., Kurano, S., and Fiechter, A. (1990). Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products. *J. Biotechnol.* **15**: 113-128.
- Kurokawa, H., Soo, P. Y., Lijima, S. and Kobayashi, T. (1994). Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 95-103.
- Lane, M. and Gardner, D. K. (1995). Removal of embryo-toxic ammonium from the culture medium by *in situ* enzymatic conversion to glutamate. *J. Exp-Zool.* **271**(5): 356-363.
- Lanks, K.W. and Li, P.W. (1988). End products of glucose and glutamine metabolism by culture cell lines. *J. Cell Physiol.* **135**: 151-155.
- Lin, A. and Agrawal, P. (1988). Glutamine decomposition in DMEM: Effect of pH and serum concentration. *Biotechnol. Lett.* **10** (10): 695-698.
- Lin, S. S., Harada, T., Hata, C., Miyawaki, O. and Nakamura, K. (1997). Nanofiltration membrane bioreactor for continuous asymmetric reduction of 2-ketoglutarate to produce L-glutamate with NADH regeneration. *J. Ferment Bioeng.* **83**(1): 54-58.
- Linardos, T. I., Kalogerakis, N., Behie, L. A. (1992). Monoclonal antibody production in dialyzed continuous suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 504-510.
- Ljunggren, J. and Häggström, L. (1990). Glutamine limited fed-batch culture reduces ammonium ion production in animal cells. *Biotechnol. Lett.* **12**: 705-710.
- Ljunggren, J. and Häggström, L. (1994). Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 808-818.
- Luan, Y. T., Mutharasan, R. and Magee, W. E. (1987). Strategies to extend the longevity of hybridomas in culture and promote yield of monoclonal antibodies. *Biotechnol. Lett.* **9**: 691-696.
- Lustig, K. D., Sportiello, M. G., Erb, L., Weisman, G. A. (1992) A nucleotide receptor in vascular endothelial cells is specifically activated by the fully ionized forms of ATP and UTP. *J. Biochem.* **284**: 733-9.
- Male, K. B., Luong, J. H. T., Tom, R., and Mercille, S. (1993). Novel FIA amperometric biosensor system for the determination of glutamine in cell culture systems. *Enzyme Microb. Technol.* **15**(1): 26-32.
- Martins, K. and Häggström, L. (1993). Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes. *J. Biotechnol.* **30**: 339-350.

- McDermott, R. C. and Butler, M. (1993). Uptake of glutamate, not glutamine synthetase, regulates adaptation of mammalian cells to glutamine free medium. *J. Cell Sci.* **104**: 51-58.
- McQueen, A. and Bailey, J. E. (1990). Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 1067-1077.
- McQueen, A. and Bailey, J. E. (1991). Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: correlation with effects on intracellular pH. *Bioprocess Eng.* **6**: 49-61.
- Miller, W. M. and Blanch, H.W. (1991). Regulation of animal cell metabolism in bioreactors. In *Animal cell bioreactors*. Ho, C.S. and Wang, D.I.C. Eds. Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA. Pp. 119-159.
- Miller, W. M., Wilke, C.R. and Blanch, H.W. (1988). Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioprocess Eng.* **3**: 113-122.
- Miller, W.M., Wilke, C.R. and Blanch, H.W. (1989). The transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture. II. glutamine pulse and step changes. *Biotech. Bioeng.* **33**: 487-499.
- Morris, J. G. (1993). *Fisicoquímica para biólogos*. Serie de biología fundamental. Conceptos básicos para las facultades de medicina, farmacia y biología., Editorial Reverté, S.A. Pp. 80-96.
- Nagy, P., Panyi, G., Jenei, A., Bene, L., Gaspar, R. J., Matko, J. and Damjanovich, S. (1995). Ion-channel activities regulate transmembrane signaling in thymocyte apoptosis and T-cell activation. *Immuno Lett.* **44**(2-3): 91-95.
- Nayve, Jr. F. R. P., Misato, T., Matsumura, M. and Kataoka, H. (1994). HBs-MAb production in perfusion culture with selective ammonia removal system. *J. Biotechnol.* **34**: 217-225.
- Nayve, Jr. F. R. P., Motoki, M., Matsumura, M. and Kataoka, H. (1991). Selective removal of ammonia from animal cell culture broth. *Cytotechnol.* **6**: 121-130.
- Newland, M., Nazlee, K. M., Greenfiel, P. F. and Nielsen, L. K. (1994). Ammonia inhibition of hybridoma propagated in batch, fedbatch, and continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 434-438.
- Ozturk, D. H. and Colman, R. F. (1991). Identification of cysteine-319 as target amino acid of 8-[(4-Bromo-2,3-dioxobutyl) thio] adenosine 5'-triphosphate in bovine liver glutamate dehydrogenase. *Biochem.* **30**(29):7126-7134.
- Ozturk, D. H., Safer, D. and Colman, R. F. (1990). Affinity labeling of bovine liver glutamate dehydrogenase with 8-[(4-Bromo-2,3-dioxobutyl) thio] adenosine 5'-diphosphate and 5'-triphosphate. *Biochem.* **29**(30): 7112-7118.
- Ozturk, S. S. and Palsson, B. O. (1990). Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: Effect of media type, pH and serum concentration. *Biotechnol. Prog.* **6**: 121-128.

- Ozturk, S. S., Riley, M. R. and Palsson, B. O. (1992). Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 418-431.
- O'Connor, K. C. and Bailey, J. E. (1989). ESR Investigations of free and Immobilized glutamate dehydrogenase. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 110-116.
- Ramírez, O. T. (1996). Alternativas para contender con el problema de la toxicidad del amonio en cultivos de células de eucariotes superiores. en *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. Galindo, E. Ed. Pp. 219-232.
- Ramírez, O. T. and Mutharasan, R. (1990). Cell cycle-and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hibridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 839-848.
- Ryll, Thomas., Valley, Ulrich., and Wagner, Roland. (1994). Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotechnol. and Bioeng.* **44**: 184-193.
- Schneider, M., El Alaoui M., von Stockar U. and Marison I.W. (1997). Batch cultures of a hybridoma cell line performed with *in-situ* ammonia removal. *Enzyme Microb. Technol.* **20**(4): 268-276.
- Schneider, M., Marison, I. W., von Stockar, U. (1996). The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.* **46**: 161-185.
- Schumpp, B. and Schlaeger, E. J. (1992). Growth study of lactate and ammonia double-resistant clones of HL-60 cells. In *Animal cell technology: Developments, processes and products*. Spier R. E., Griffiths, J. B. and Macdonald, C. Eds. Butterworth-Heinemann. Pp 183-185.
- Sikdar, S. K. and Sawant, S. B. (1994). Ammonia removal from mammalian cell culture medium by ion-exchange membranes. *Sep. Sci. Technol.* **29**: 1579-1591.
- Smith, G., Summers, M. and Fraser, M. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 2156-2165.
- Tabata, M. and Kido, T. (1991). Usefulness of immobilized glutamine synthetase for the removal of ammonia and its application to the determination of creatinine in urine. *Analytica Chimica Acta.* **225**: 83-90.
- Thömmes, J., Garske, U., Biselli, M. and Wandrey, C. (1992). Integrated detoxificación: reduction of ammonium concentration by dialysis with cation exchange membranes. In: *Proceeding of the 11th ESACT Meeting*, Brighton, UK. 171-175.
- van der Pol, J. J., Spohn, U., Eberhardt, R., Gaetgens, J., Biselli, M., Wandrey, C. and Tramber, J. (1994). On-line monitoring of an animal cell culture with multi-channel flow injection analysis. *J. Biotechnol.* **37**(3): 253-264.
- Vandewalle, B., Hornez, L., Revillon, F. and Lefebvre, J. (1994). Effect of extracellular ATP on breast tumor cell growth, implication of intracellular calcium. *Cancer Lett.* **85**(1): 47-54.

- Vaughn, J., Goodwin, R., Tomkins, G. and McCawley, P. (1979). The establishment of two cell lines from the insect (Lepidoptera:Noctuidae). *In Vitro* 13: 213-217.
- Velez, D., Reuveney, S., Miller, L. and Macmillan, J. D. (1986). Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium. *J. Immunol. Methods*. 86: 45-52.
- Viallard, V., Denis, C., Trocheris, V. and Murat, J. C. (1986). Effect of glutamine deprivation and glutamate or ammonium chloride addition on growth rate, metabolism and differentiation of human colon cancer cell-line HT29. *Int. J. Biochem.* 18(3): 263-269.
- Wakisaka, S., Sung Ha-Chin., Aikawa, T., Tachiki T. and Tochikura T. (1989). Glutamate formation by a new *in vitro* enzyme system consisting of purified glutamine synthetase and glutamate synthase. *J. Ferment. Bioeng.* 67(6): 395-398.
- Xie, L. and Wang, D. I.C. (1994). Fed-batch cultivation of animal cells using diferents medium design concepts and feeding strategies. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 1175-1189.
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martín, B. M., Gurrola-Briones, G., Herion, P. and Possani, L. D. (1992). Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* 204: 281-292.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**