

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**



LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE (rhEPO)
MEDIANTE EL CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES**

TESISTA: LIC. CAROLINE DIDIER

DIRECTORA: DRA. MARINA ETCHEVERRIGARAY

CO-DIRECTOR: DR. RICARDO KRATJE

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis fueron publicados en:

Marina Etcheverrigaray, Gabriel Amadeo, **Caroline Didier**, Dardo Pereira Bacci, Federico Cavatorta y Ricardo Kratje (2003) *Physicochemical estimation of rhEPO potency produced in different culture systems*. En: *Animal Cell Technology meets Genomics* (F. Gòdia y M. Fussenegger, eds.), ISBN 1-4020-2791-5, Springer, The Netherlands, pp. 727-729.

Caroline Didier, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje y Héctor Goicoechea (2005) *RSM analysis of the influence of medium composition on the growth and metabolism of a recombinant CHO cell line*. En: Proceedings of ENPROMER 2005 – 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering and 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, Río de Janeiro, RJ, Brasil.

Caroline Didier, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje y Héctor Goicoechea (2007) *Crossed mixture design and multiple response analysis for developing complex culture media used in recombinant protein production*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 86(1):1-9.

Caroline Didier, Guillermina Forno, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje y Héctor Goicoechea (2008) *Novel chemometric strategy based on the application of artificial neural networks to crossed mixture design for the improvement of recombinant protein production in continuous culture*. Manuscrito en preparación.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquéllos que de diferentes maneras participaron y colaboraron conmigo y con este trabajo.

A Marina y a Ricardo, por su calidad profesional y fundamentalmente humana, su orientación, su apoyo y estímulo constantes, y por haberme permitido formar parte de este grupo excelente.

A Héctor, por su colaboración desinteresada, su amistad y por todo lo que me permitió aprender de él.

A Dardo, por ser mi amigo y mi ejemplo, por tantos sueños y proyectos compartidos desde los años del Centro de Estudiantes, y por creer en mí, siempre.

A Guillermina, Juan, Esteban y Sebastián T. por su gran ayuda en la última etapa de este trabajo.

A Nacho, Marcos, Claudio, Romina Z., Natalia, Matías, Federico M., Norma y Cristian por su compañerismo, y tantas horas compartidas.

A Federico C. y Lucía, por su amistad y cariño.

A Germán, Walter, Romina P., Leonardo, Luciano, Sebastián R., Darío, Lucho, Quique y Andrea P. por su participación para generar un ambiente de trabajo cálido y amistoso. A Cecilia y a Pablo, por su disponibilidad generosa para colaborar con este trabajo.

A Mary, por estar siempre pendiente, cuidándonos.

A Pancho y Chango, por el soporte permanente, y tantos mates compartidos.

A Gustavo y Carlos, por su disposición a solucionar rápidamente toda clase de problemas.

A Andrea G. y Dulcinea, por su simpatía y eficiencia. A Andrea V. por tantas horas de trabajo, muchas gracias.

A todos ellos, por construir un grupo humano excepcional, les estoy muy agradecida.

También tengo que decirle *gracias* a Elena, mi gran amiga, por infinitas horas de charla, su apoyo, su forma de escuchar sin juzgar, sus consejos, su capacidad de compartir los momentos buenos y malos; en resumen, por saber honrar la palabra *amistad*.

A Raquel y Sandro, por ser mi familia en Brasil, les estaré siempre infinitamente agradecida. A Alexandre, Marina, Rubens, Aurélio, Pedro, Wellington W., Emerson, y el resto de mis amigos y colegas del TECPAR, por su cariño, buen humor, compañerismo, y el esfuerzo puesto en un proyecto común.

A mis padres, por su ejemplo, su apoyo y su amor.

A mi hermana Patricia, por su amor y paciencia.

A mi familia y mis amigos, porque son la red invisible que me mantiene cerca a pesar de la distancia.

A Wellington, por haber decidido compartir su vida conmigo.

A la vida, por su generosidad.

A mi madre

***De estas tres cosas, voluntad, trabajo y éxito,
es que se compone la vida humana.
La voluntad abre las puertas de una carrera feliz,
el trabajo todo lo vence y el éxito corona la obra.***

Louis Pasteur (1822-1895)

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y UNIDADES	<i>viii</i>
RESUMEN	<i>xiii</i>
SUMMARY	<i>xiv</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El clon productor	2
1.2. El sistema de cultivo	2
1.3. El medio de cultivo	3
1.4. Células de mamíferos utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas. Características	3
1.5. Metabolismo de las líneas celulares continuas de mamífero (LCCm)	6
1.5.1. Fuentes de carbono: glucosa, galactosa y manosa	6
1.5.2. Aminoácidos: glutamina, glutamato y asparagina	12
1.5.3. Productos del catabolismo: lactato y amonio	17
1.6. Parámetros fisicoquímicos del cultivo de las LCCm	20
1.6.1. Oxígeno	21
1.6.2. Temperatura	22
1.6.3. pH	22
1.6.4. Osmolalidad	23
1.7. Glicosilación de proteínas recombinantes de uso terapéutico. Factores que la afectan	24
1.8. Medios de cultivo	28
1.9. Sistemas de cultivo celular	30
1.9.1. Sistemas adherentes	31
1.9.2. Sistemas en suspensión	31
1.10. Modos de cultivo	32
1.10.1. Modo de cultivo por lote (<i>batch</i>)	32
1.10.2. Modo de cultivo por lote alimentado (<i>fed-batch</i>)	33
1.10.3. Modo de cultivo continuo en quimiostato	33
1.10.4. Modo de cultivo continuo con perfusión	33
1.11. Eritropoyetina humana recombinante	34
2. OBJETIVOS	39
2.1. Objetivos generales	40
2.2. Objetivos específicos	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Líneas celulares	42
3.1.1. Línea rhEPO-CHO.K1	42
3.1.2. Clon Hy2B2	42
3.2. Medios de cultivo	42
3.2.1. Condiciones generales	42
3.2.2. Medio de cultivo estándar con alto contenido de glucosa y glutamina (MCE-AGG)	43
3.2.3. Medio de cultivo estándar (MCE)	44
3.2.4. Medio SMIF 6	44
3.2.5. Medio Zell-C	44
3.2.6. Medio de cultivo para hibridomas	45
3.3. Criopreservación de células	45
3.3.1. Congelación	46
3.3.2. Descongelación	46
3.4. Cultivo de células	46
3.4.1. Clonado celular	46
3.4.2. Cultivos estáticos de células adherentes	47
3.4.3. Cultivo de células en suspensión	48
3.4.3.1. Cultivo de células en frascos agitados tipo <i>spinner</i>	48
3.4.3.2. Cultivo de células en un biorreactor de agitación	48

3.5. Determinaciones analíticas en cultivos celulares	50
3.5.1. Determinación de la concentración de células viables y totales	50
3.5.2. Determinación de la concentración de glucosa y lactato	51
3.5.3. Determinación de la concentración de glutamina y glutamato	52
3.5.4. Determinación de la concentración de amonio	52
3.5.5. Determinación de la osmolalidad	53
3.6. Cálculo de los parámetros celulares específicos	54
3.6.1. Cálculo de la integral de células viables (ICV)	54
3.6.2. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento celular (μ)	55
3.6.3. Cálculo de las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos (q_x)	57
3.7. Obtención del anticuerpo monoclonal 2B2 anti-rhEPO	58
3.7.1. Producción <i>in vivo</i> del MAb 2B2	58
3.7.2. Purificación del MAb 2B2 obtenido <i>in vivo</i>	58
3.7.3. Producción <i>in vitro</i> del MAb 2B2	59
3.8. Métodos de <i>screening</i> y cuantificación de rhEPO	59
3.8.1. Técnica de <i>immunodot</i>	59
3.8.2. Técnica de ELISA	61
3.9. Determinación del patrón de isoformas de rhEPO: Isoelectroenfocado (IEF)	62
3.9.1. Tinción con azul brillante de <i>Coomasie</i>	63
3.9.2. Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa	63
3.9.3. <i>Western blot</i>	64
3.9.4. Densitometría de bandas	64
3.10. Purificación de rhEPO	64
3.10.1. Purificación y concentración de volúmenes pequeños	65
3.10.2. Purificación y concentración de volúmenes medios	66
3.11. Reactivos químicos y soluciones	68
3.11.1. Soluciones empleadas para el recuento y el subcultivo de células	68
3.11.2. Reactivos empleados en la determinación de amonio	68
3.11.3. Soluciones empleadas en el <i>immunodot</i> para la semicuantificación de rhEPO	68
3.11.4. Soluciones empleadas en el ELISA para la cuantificación de rhEPO	68
3.11.5. Soluciones empleadas en el isoelectroenfocado de rhEPO	69
3.11.6. Soluciones empleadas en tinción de proteínas	69
3.11.7. Soluciones varias	69
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN - CAPÍTULO 1: <i>Obtención, caracterización y adaptación a suspensión de un clon productor de rhEPO</i>	70
4.1. Objetivos	71
4.2. Introducción	71
4.2.1. Coeficiente de correlación <i>R</i>	73
4.3. Desarrollo experimental	75
4.4. Resultados	75
4.4.1. Cultivo de líneas celulares productoras de rhEPO	75
4.4.2. Determinación de la productividad específica de rhEPO	76
4.4.3. Clonado de líneas celulares productoras de rhEPO y selección de clones	77
4.4.4. Caracterización del crecimiento de los clones seleccionados	79
4.4.5. Caracterización del perfil de isoformas de rhEPO producidas por los clones seleccionados	87
4.4.6. Estudio comparativo entre los medios MCE-AGG y MCE, utilizando un sistema símil perfusión	89
4.4.7. Adaptación al crecimiento en suspensión de los clones B1A2 y C4H8 en los medios MCE y SMIF 6	94
4.4.7.1. Protocolo de adaptación progresiva de Scharfenberg y Wagner	95
4.4.7.2. Adaptación progresiva del clon B1A2 al crecimiento en suspensión en medio MCE	97
4.4.7.3. Adaptación progresiva del clon B1A2 al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6	103
4.4.7.4. Adaptación progresiva del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en medio MCE	105
4.4.7.5. Adaptación progresiva del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6	108

4.4.7.6. Adaptación del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en un paso	111
4.4.8. Evaluación del crecimiento y productividad de los clones B1A2, C4H8c y C4H8d en diferentes sistemas y medios de cultivo	113
4.4.8.1. Evaluación del crecimiento y la productividad del clon C4H8c antes y después de la adaptación a suspensión en diferentes medios de cultivo	113
4.4.8.2. Efecto de la adición de SFB al medio de cultivo SMIF 6	119
4.4.8.3. Efecto del sistema de cultivo	121
4.4.8.4. Evaluación del crecimiento en suspensión y la productividad de los clones B1A2, C4H8c y C4H8d en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB	126
4.4.8.5. Evaluación del crecimiento en suspensión y la productividad de los clones B1A2, C4H8c y C4H8d en medio SMIF 6	129
4.5. Conclusiones	133
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN - CAPÍTULO 2: Estudio del efecto del agregado al medio de cultivo de diferentes componentes sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2	137
5.1. Objetivos	138
5.2. Introducción	138
5.3. Desarrollo experimental	145
5.4. Resultados	146
5.4.1. Efecto de la adición de GlcNac al medio de cultivo	146
5.4.2. Estudio del efecto de la adición de GlcNac sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2	147
5.4.3. Estudio del efecto de la adición de GlcNAc y ManNAc sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2	152
5.4.4. Estudio de la descomposición térmica de la glutamina presente en el medio de cultivo MCE al 0,2% (V/V) SFB	158
5.4.5. Estudio del efecto del ion amonio presente en el entorno celular sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2	163
5.4.6. Estudio del efecto de la osmolalidad sobre el crecimiento y la productividad celulares	170
5.4.6.1. Estudio del efecto de un medio de cultivo hiperosmolal sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2	170
5.4.6.2. Estudio del efecto de un medio de cultivo hipoosmolal sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2	176
5.4.6.3. Estudio de la capacidad de un medio de cultivo hipoosmolal para mantener el crecimiento y la productividad del clon B1A2 en cultivos de alta densidad	190
5.4.6.4. Estudio de la influencia de diferentes fuentes de carbono adicionadas a un medio de cultivo hipoosmolal (216 mOsm kg ⁻¹) sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2	194
5.5. Conclusiones	197
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN - CAPÍTULO 3: Diseño de medios de cultivo optimizados para la producción de rhEPO en procesos batch, mediante el diseño de experimentos y el análisis de resultados a través de la metodología de superficies de respuesta	202
6.1. Objetivos	203
6.2. Introducción	203
6.2.1. Diseño de experimentos	203
6.2.2. Metodología de superficies de respuesta	205
6.2.3. Diseño experimental de mezclas	206
6.2.4. Modelos polinómicos utilizados para ajustar las superficies	209
6.2.5. Diseño experimental de mezclas cruzadas	209
6.2.6. Función deseabilidad global	211
6.3. Desarrollo experimental	213
6.4. Resultados	214
6.4.1. Diseño experimental de mezclas cruzadas	214
6.4.1.1. Consideraciones generales con respecto a las experiencias en los medios de cultivo Zell-C4, Zell-C5, Zell-C6, Zell-C7 y Zell-C8	217

6.4.2. Análisis de las curvas metabólicas	226
6.4.3. Análisis del perfil de isoformas	232
6.4.4. Modelado de respuestas mediante RSM	241
6.4.5. Estudio de las respuestas: análisis simple	244
6.4.6. Estudio de las respuestas: análisis integral	255
6.5. Conclusiones	259
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN - CAPÍTULO 4: <i>Diseño de medios de cultivo optimizados para la producción de rhEPO en procesos batch y en procesos continuos, mediante el diseño de experimentos y el análisis de resultados por redes neuronales artificiales</i>	261
7.1. Objetivos	262
7.2. Introducción	262
7.3. Desarrollo experimental	268
7.4. Resultados	268
7.4.1. Optimización de medios de cultivo	268
7.4.1.1. Cultivo del clon B1A2 en reactor en modo <i>batch</i>	268
7.4.1.2. Cultivo del clon B1A2 en reactor en modo continuo con perfusión	268
7.4.2. Proceso de análisis de resultados mediante ANN	269
7.4.2.1. Definición del conjunto de calibración y del conjunto de monitoreo	270
7.4.2.2. Definición del conjunto de prueba	271
7.4.2.3. Definición de las respuestas a ser consideradas	271
7.4.2.4. Entrenamiento de cinco ANN para cada respuesta en estudio	273
7.4.2.5. Selección de dos ANN para cada respuesta	275
7.4.2.6. Predicción de las respuestas para el conjunto de prueba	276
7.4.2.7. Definición y cálculo para cada respuesta de la función <i>deseabilidad parcial</i> d_i	276
7.4.2.8. Definición y cálculo de la función <i>deseabilidad global</i> D	278
7.4.2.9. Análisis de las mezclas de los seis factores para las que se obtuvieron los valores más altos de la función D	281
7.4.2.10. Definición de los medios de cultivo Zell-C12, Zell-C13 y Zell-C14	286
7.5. Conclusiones	287
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN - CAPÍTULO 5: <i>Evaluación de medios de cultivo optimizados para la producción de rhEPO en cultivo continuo en un biorreactor con perfusión</i>	289
8.1. Objetivos	290
8.2. Introducción	290
8.3. Desarrollo experimental	291
8.4. Resultados	291
8.4.1. Medios de cultivo evaluados	291
8.4.2. Configuración del biorreactor empleado	292
8.4.3. Cultivo del clon B1A2 en el biorreactor	297
8.5. Conclusiones	304
9. CONCLUSIONES GENERALES	306
10. ANEXOS	309
10.1. ANEXO 1: ANOVA de una vía para la comparación de las medias de los distintos tratamientos	310
10.2. ANEXO 2: Comparaciones pareadas entre medias de diferentes tratamientos por el método de Mínima Diferencia de Cuadrados (<i>Least Square Difference, LSD</i>)	311
10.3. ANEXO 3: Composición de las 800 mezclas del conjunto de prueba utilizado en el entrenamiento de las redes neuronales artificiales	312
10.4. ANEXO 4: Respuesta predicha por la red versus la respuesta nominal	319
10.5. ANEXO 5: Evolución de RMSEC y RMSEP en función del número de épocas del entrenamiento de las redes seleccionadas para cada respuesta	325
11. BIBLIOGRAFÍA	327

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AB	Actividad biológica
AB _t	Actividad biológica teórica
AcCoA	Acetil coenzima A
ADP	Adenosina difosfato
Ala	Alanina
AlaAT	Alanina aminotransferasa
ANN	<i>Artificial Neural Networks</i> , redes neuronales artificiales
ANOVA	Análisis de la varianza
APS	Persulfato de amonio
Asn	Asparagina
AspAT	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i> , células de riñón de cría de hámster
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , albúmina sérica bovina
cél.	Células
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> , células de ovario de hámster chino
CMP-NeuNAc	Ácido N-acetil-neuramínico-citidínmonofosfato
col.	Colaboradores
Conc.	Concentración
CP	Carbamilfosfato
CTP	Citidina trifosfato
Cys	Cisteína
CZE	<i>Capillar Zone Electrophoresis</i> , electroforesis capilar zonal
D	Función deseabilidad global
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DHFR	Dihidrolato reductasa
d _i	Función deseabilidad parcial
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido de sodio
DO	<i>Dissolved Oxygen</i> , oxígeno disuelto
DOE	<i>Design of Experiments</i> , diseño de experimentos
Ec.	Ecuación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> , enzimoimmunoensayo
EM II	Enzima mítica mitocondrial de tipo II
EPO	Eritropoyetina
EPOR	Receptor para la EPO
F _a	Frecuencia absoluta

<i>Fr</i>	Frecuencia relativa
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> , hormona folículo estimulante
Fig.	Figura
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> , cromatografía rápida de proteínas en fase líquida
Frc	D-Fructosa
Frc-1-P	D-Fructosa-1-fosfato
Frc-6-P	D-Fructosa-6-fosfato
Frc-1,6-P ₂	D-Fructosa-1,6-difosfato
GA	Gliceraldehído
Gal	D-Galactosa
Gal-1-P	D-Galactosa-1-fosfato
Gal-6-P	D-Galactosa-6-fosfato
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
GAP	Gliceraldehído fosfato
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GDP	Guanidina difosfato
GDP-Man	Guanidín difosfato manosa
GK	Galactoquinasa
Glc	D-Glucosa
Glc-6-P	D-Glucosa-6-fosfato
GlcN	D-glucosamina
GlcN-6-P	D-glucosamina-6-fosfato
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
GlcNAc-1-P	N-acetil-D-glucosamina-1-fosfato
Gln	Glutamina
Glnasa	Glutaminasa
Glu	Glutamato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
hEPO	Eritropoyetina humana
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , virus de la inmunodeficiencia humana
HK	Hexoquinasa
ICV	Integral en el tiempo de células viables
IEF	<i>Isoelectric focusing</i> , isoelectroenfocado
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
k_d	velocidad específica de muerte celular
K_M	Constante de Michaelis-Menten
Lac	Lactato
LacNAc	N-acetil-lactosamina
LCCm	Líneas celulares continuas de mamífero

LDH	Lactato deshidrogenasa
LSD	<i>Least Square Method</i> , método de los cuadrados mínimos
<i>M</i>	Constante de momento
M/A	(Lanzadera) malato-aspartato
MAb	Anticuerpo monoclonal
Man	D-Manosa
ManNAc	N-acetil-D-manosamina
ManNAc-6-P	N-acetil-D-manosamina-6-fosfato
Man-1-P	D-Manosa-1-fosfato
Man-6-P	D-Manosa-6-fosfato
MCE	Medio de cultivo estándar
MCE-AGG	Medio de cultivo estándar con alto contenido de glucosa y glutamina
mMalato	Malato mitocondrial
mPiruvato	Piruvato mitocondrial
NAD ⁺	Nicotina-adenina-dinucleótido
NADH	Nicotina-adenina-dinucleótido (forma reducida)
ND	No detectable
nd	No determinado
NeuNAc	Ácido N-acetilneuramínico
NeuNAc-9-P	Ácido N-acetilneuramínico-9-fosfato
NeuNGc	Ácido N-glicolilneuramínico
OAA	Ácido oxalacético
OPD	<i>o</i> -fenilendiamina
<i>P</i>	Valor estadístico <i>P</i>
PBS	Solución salina de fosfatos
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPyrCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK	Fosfofructoquinasa
pl	Punto isoeléctrico
PMI	<i>Phosphomannose isomerase</i> , fosfomanosa isomerasa
PPC	<i>Pentose-phosphate cycle</i> , ciclo de las pentosas fosfato
Pyr	Piruvato
PyrC	Piruvato carboxilasa
PyrDH	Piruvato deshidrogenasa
PyrK	Piruvato quinasa
q_x	Velocidad específica de consumo o producción del compuesto <i>x</i>
<i>R</i>	Coefficiente de correlación
R^2	Coefficiente de determinación
Rib-5-P	Ribosa-5-fosfato
rh	Recombinante humano
rhEPO	Eritropoyetina humana recombinante

RMSEC	<i>Root mean square error of calibration</i> , raíz del cuadrado medio del error de calibración
RMSEP	<i>Root mean square error of prediction</i> , raíz del cuadrado medio del error de predicción
RSM	<i>Response Surface Methodology</i> , Metodología de superficies de respuesta
S-I	Sistema de transporte I
S-II	Sistema de transporte II
SD	Desviación estándar
Sn	Sobrenadante de cultivo
SEM	Error estándar de la media
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
S _{N2}	Sustitución nucleofílica de tipo 2
Sp	Frasco <i>spinner</i>
SS _T	<i>Total Square Sum</i> , suma de cuadrados total
t	Tiempo
T	Temperatura
TA	Temperatura ambiente
TBS	Solución salina de Tris
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> , factor de crecimiento transformante
Thr	Treonina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UDP-GalNAc	Uridina difosfato N-acetilgalactosamina
UDP-GlcNAc	Uridina difosfato N-acetilglucosamina
UDP-GNAc	Uridina difosfato N-acetilgalactosamina más uridina difosfato N-acetilglucosamina
UTP	Uridina trifosfato
V _R	Volumen del biorreactor
X _M	Concentración de células no viables
X _T	Concentración de células totales
X _V	Concentración de células viables
\bar{X}	Promedio
Y _{lac/glc}	Rendimiento de lactato generado a partir de glucosa
Y _{am/gln}	Rendimiento de amonio generado a partir de glutamina
Y _{X/glc}	Rendimiento de células obtenidas por mol de glucosa
αKG	α-cetoglutarato
Δ	Variación
θ	Constante del bias
λ	Longitud de onda
μ	Velocidad específica de crecimiento

UNIDADES

°C	grado Celsius
% P/V	gramo de soluto en 100 ml de solución
% V/V	mililitro de soluto en 100 ml de solución
bar	unidad de presión equivalente a 100.000 pascales
cm	centímetro
d	día
g	gramo
<i>g</i>	fuerza de gravedad terrestre
h	hora
kDa	kilodalton
kg	kilogramo
l	litro
M	mol por litro
mA	miliamperio
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol por litro
molal	mol de soluto por kg de solvente puro
mOsm kg ⁻¹	miliosmol por kilogramo de solvente puro
MΩ	mega-ohmio
nm	nanómetro
nmol	nanomol
Osm	osmol
rpm	revoluciones por minuto
UI	unidades internacionales de actividad biológica
V	voltio
W	vatio
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromol por litro

RESUMEN

En este trabajo de tesis se presentan los resultados obtenidos durante la optimización de la producción de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) en cultivo de células animales. El proceso de optimización se abordó desde tres aspectos diferentes: la obtención y selección de un nuevo clon productor, el estudio del efecto de nuevos aditivos y variables fisicoquímicas (particularmente, la osmolalidad del medio) sobre el crecimiento, la productividad y el patrón de isoformas producidas por el clon seleccionado, y finalmente, el diseño racional de dos medios de cultivos que permiten obtener una molécula de rhEPO de alta calidad glicosídica.

Inicialmente se clonaron líneas celulares recombinantes productoras de rhEPO, analizándose los parámetros metabólicos de los clones obtenidos, a partir de los cuales se escogieron dos de ellos. Estos clones fueron adaptados a crecer en suspensión en frascos agitados tipo *spinner*, en un medio de cultivo de bajo contenido de suero y en un medio libre de proteínas. Se estudió además el efecto que ejercen sobre el metabolismo celular diferentes metodologías de adaptación a suspensión, concentraciones de suero y sistemas de cultivo (adherencia o suspensión). Se seleccionó el clon B1A2 como clon productor a ser utilizado en las experiencias siguientes.

Posteriormente se evaluó, mediante un diseño factorial, la influencia de la adición al medio de cultivo de aminoazúcares que forman parte de las cadenas hidrocarbonadas de la rhEPO, así como de la acumulación del ion amonio en el sobrenadante, estableciéndose el grado de sensibilidad del clon productor frente a esta última especie. Dentro de este conjunto de experiencias se estudió también el efecto de la osmolalidad sobre el crecimiento, la productividad y el patrón de glicosilación, mediante el cultivo del clon productor en medios hipo-, iso- e hiperosmolales. Se determinó así que la actividad biológica de la molécula de rhEPO producida varía en forma inversamente proporcional a la osmolalidad del medio.

Utilizando un diseño experimental de mezclas cruzadas con limitaciones, acoplado a un análisis multivariado de las respuestas - en primer lugar mediante la metodología de superficies de respuesta y, posteriormente, mediante la aplicación de redes neuronales artificiales - seguido de un proceso de optimización, se procedió a diseñar dos medios de cultivo con el objetivo de optimizar la producción de rhEPO. Estos medios fueron utilizados durante el cultivo del clon productor en un biorreactor tipo tanque agitado, con aireación libre de burbujas, en modo continuo con perfusión, cumpliéndose el objetivo de obtener una molécula de rhEPO de alta calidad glicosídica. Merece destacarse que la aplicación de estas metodologías analíticas resultó novedosa en el área de la producción de proteínas recombinantes en cultivos de células de mamíferos.

SUMMARY

In this thesis report, results obtained during the production of recombinant human erythropoietin (rhEPO) by means of animal cell culture are presented. The optimization process was developed following three different approaches: obtainment and selection of a new clone, study of the effect of new additives and physicochemical variables (particularly, medium osmolality) on growth, productivity and isoform pattern, and finally, rational design of two culture media in which highly glycosylated rhEPO molecules are obtained.

Firstly, recombinant cell lines producing rhEPO were cloned. Metabolic parameters of the obtained clones were analyzed and two of them were selected. These clones were adapted to grow in suspension mode using spinner flasks, in low-serum-content medium and in protein-free medium. The effect of different methodologies for adapting cells to suspension growth, as well as different serum concentrations and culture systems (adherent or suspension) were studied. Clone B1A2 was selected to perform the following experiments.

The addition of two aminosugars, which are part of the hydrocarbonated chains of rhEPO, as well as the effect of the accumulation of the ammonium ion in the supernatant were evaluated. The sensitivity of the clone B1A2 to ammonium was established. As part of this set of experiments, the influence of osmolality on growth, productivity and glycoform pattern was determined by culturing this clone in hypo-, iso- and hyperosmolal media. It was found that the biological activity of rhEPO varies linearly with medium osmolality.

Two culture media which improve rhEPO production were designed using a constrained crossed-mixture experimental design, followed by multivariate analysis of responses: firstly, through response surface methodology, and later, by artificial neural networks, coupled to an optimization process. The formulated media were used for cultivating the selected clone in a stirred tank bioreactor with bubble-free aeration, in continuous mode by media perfusion, accomplishing the pursued goal, a highly glycosylated molecule. It should be remarked that this analytical approach was used for the first time in the area of production of recombinant proteins in mammalian cell cultures.

1-INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de fármacos proteicos recombinantes para ser utilizados en terapias de reemplazo o para incrementar los niveles de ciertas proteínas naturales en el tratamiento de numerosas patologías constituye una de las principales aplicaciones de la biotecnología moderna a la salud humana (Savage, 1997). La optimización de la producción de biofármacos en líneas celulares animales en cultivo se ha convertido en un área clave de investigación. Estos productos representan actualmente un segmento importante del mercado farmacéutico mundial.

La optimización de un proceso de producción de una glicoproteína recombinante, desde el punto de vista del cultivo de las células de mamífero productoras, puede llevarse a cabo modificando los siguientes aspectos:

1.1. EL CLON PRODUCTOR

Si la línea celular elegida no satisface los requerimientos exigidos para la producción de la proteína de interés podría ser necesario utilizar una línea celular diferente. Una mejor opción puede ser seleccionar otro clon de la misma línea celular, que presente mejores parámetros de crecimiento, demuestre mayor productividad y/o produzca una molécula de mejor calidad glicosídica. Por otra parte, y a pesar de que se trata de una alternativa más compleja, es factible realizar modificaciones genéticas al clon utilizado que mejoren estas características, como por ejemplo insertar genes que codifican para enzimas con actividad glicosiltransferasa o sialiltransferasa (para mejorar la glicosilación), enzimas que conecten la vía glicolítica con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (con el fin de mejorar el rendimiento energético de la glucosa), enzimas para la síntesis de nutrientes (como la glutamina sintetasa) u otras que optimicen el metabolismo celular.

1.2. EL SISTEMA DE CULTIVO

Es posible aumentar la productividad celular mediante la utilización de un sistema de cultivo más eficiente, sustituyendo por ejemplo los cultivos en adherencia por el cultivo en suspensión en biorreactores, u optando por cultivo continuo en lugar de cultivo en modo *batch*. Una vez definido el sistema a utilizar, pueden ajustarse las variables de proceso - como por ejemplo la velocidad de agitación, pH, nivel de pO_2 , temperatura, nivel de pCO_2 -, con el objetivo de elevar el crecimiento y la productividad celulares.

1.3. EL MEDIO DE CULTIVO

Las células de mamífero poseen complejos requerimientos nutricionales, que varían entre las diferentes líneas celulares. Por esta razón, el diseño de un medio de cultivo específico para el clon productor de la glicoproteína de interés en estudio que maximice su crecimiento, optimice sus flujos metabólicos, aumente la productividad específica de la proteína y permita obtener una molécula altamente glicosilada, resulta una alternativa atractiva durante la optimización del proceso productivo.

En este trabajo de tesis se abordaron los tres aspectos mencionados, desde un enfoque eminentemente tecnológico. En primer lugar, se seleccionó y estudió un nuevo clon productor de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO), obtenido a partir de una línea de células CHO, que fue adaptado al crecimiento en suspensión con el fin de utilizarlo en el proceso productivo de la rhEPO llevado a cabo en un sistema de cultivo continuo en perfusión en un biorreactor de agitación. Se evaluó también el efecto de diferentes aditivos sobre el crecimiento celular y la calidad glicosídica de la hormona, para finalmente diseñar un medio de cultivo libre de proteínas a ser empleado en la producción industrial de la glicoproteína, como sustituto del medio de cultivo actualmente utilizado, el cual requiere la adición de suero fetal bovino.

1.4. CÉLULAS DE MAMÍFEROS UTILIZADAS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS. CARACTERÍSTICAS.

Gracias a su habilidad de realizar complejas modificaciones pos-traduccionales, las células de mamífero se emplean cada vez más frecuentemente en la producción de proteínas de uso terapéutico y diagnóstico. Las modificaciones pos-traduccionales incluyen una serie de reacciones como, por ejemplo, la formación o la ruptura de enlaces covalentes, proceso por el cual una cadena polipeptídica recientemente sintetizada se convierte en una proteína funcional (Han y Martinage 1991; 1992; 1993). A pesar de que actualmente se conoce un gran número de modificaciones pos-traduccionales, una de las que sin duda despierta mayor interés para los biotecnólogos que emplean células de mamíferos como sistema de expresión es la *glicosilación*. Las células de mamíferos poseen una maquinaria enzimática que les permite secretar proteínas recombinantes cuya glicosilación es similar a la humana (Lamotte y col., 1997; Chu y Robinson, 2001), lo que las convierte en únicas hospederas aceptables para la expresión de glicoproteínas cuya funcionalidad se encuentra estrechamente relacionada con la presencia y composición de sus cadenas hidrocarbonadas.

En la producción industrial de proteínas recombinantes para uso terapéutico se utiliza actualmente un bajo número de líneas celulares de mamífero. Las más extensamente utilizadas son las líneas celulares CHO (*Chinese Hamster Ovary*, células de ovario de hámster chino) y BHK (*Baby Hamster Kidney*, células de riñón de cría de hámster) (Hauser, 1997; Savage, 1997; Baker y col., 2001). Estas células presentan características que las hacen aptas para su empleo en procesos a escala industrial (Tabla I). Esto se debe a las exigencias de los organismos reguladores y de control, ya que una vez que una línea celular es considerada segura resulta más sencillo lograr la aprobación de nuevos procesos cuando en éstos se emplea alguna de estas líneas.

Las células CHO fueron cultivadas por primera vez por Puck y col. (1958) a partir de la biopsia de un ovario de una hembra de hámster chino. De estas células originales varios investigadores han clonado sub-líneas con varias deficiencias, lo que ha permitido su utilización en diferentes procesos para la expresión de proteínas recombinantes.

Tabla I: Propiedades de las líneas celulares utilizadas en la producción de proteínas recombinantes (adaptado de Hauser, 1997).

Propiedad	Ejemplo
Expresión eficiente de genes heterólogos	Procesamiento transcripcional y pos-transcripcional, síntesis de proteínas, secreción
Modificaciones pos-traduccionales	Plegamiento de proteínas, glicosilación, fosforilación
Estabilidad de la expresión de genes heterólogos	Estabilidad cromosómica
Agentes adventicios	Ausencia de virus, micoplasmas
Requerimientos de cultivo	Suero, factores de crecimiento, nutrientes
Propiedades productivas	Crecimiento en alta densidad, resistencia a fuerzas de corte, adaptación a suspensión, alta productividad

La línea celular CHO es actualmente una de las más utilizadas para la expresión de glicoproteínas recombinantes humanas (Yang y Butler, 2000a; Yoon y col., 2005; Restelli y col., 2006), debido a que las enzimas que glicosilan son similares a aquéllas encontradas en líneas celulares humanas (Lee y col., 1989; Jenkins y Curling, 1994). En ellas se han expresado proteínas recombinantes tales como la EPO, la hormona folículo estimulante (FSH), los Factores VIII y IX, los interferones beta y gamma (IFN- β e IFN- γ), la glicoproteína de la envoltura del HIV (HIV1-gp120), el activador tisular del plasminógeno (t-PA), la glicoproteína HSV-gB2 del virus *Herpes simplex*, la hormona paratifoidea, el antígeno de superficie de la hepatitis B, los factores de crecimiento transformantes alfa y beta (TGF- α y

TGF- β), entre otras proteínas (Clough, 1998). Estas células están muy bien caracterizadas, son relativamente estables, son capaces de expresar proteínas heterólogas en altos niveles, realizan un procesamiento pos-traducciona similar al de la proteína nativa y pueden crecer en cultivo tanto en forma adherente como en suspensión.

En lo que se refiere a la bioseguridad asociada al uso de estas células, Weibe y col. (1989) analizaron 44 virus patogénicos para humanos, de los cuales solamente los virus parainfluenza 1, 2 y 3, paperas, y REO 1, 2 y 3 mostraron signos de haber infectado las células en estudio. Las células CHO no fueron infectadas por virus de alto riesgo para la salud como por ejemplo HIV, hepatitis B o poliomielitis, por lo que la probabilidad de que estos virus se encuentren asociados a la proteína producida en estas células es extremadamente baja.

Las células CHO dhfr⁻ se caracterizan por carecer de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), por lo que proveen un sistema de expresión que les permiten ser cotransfectadas con un plásmido que contenga el gen de una proteína particular junto con el gen de esta enzima (Urlaub y col., 1986). Este gen se amplifica usando metotrexato (un análogo del folato que inhibe a la DHFR), lo que también amplifica al gen cotransfectado de interés que se encuentra flanqueando al gen DHFR. Las células CHO dhfr⁻ requieren hipoxantina y timidina, así como los aminoácidos glicina y prolina para su crecimiento. Particularmente para estas células, una alta secreción de alanina al medio de cultivo como forma de detoxificación del amonio generado intracelularmente resulta perjudicial, debido a que la alanina es un inhibidor competitivo del transportador de prolina (Altamirano y col., 2006b).

Las células CHO expresan constitutivamente el gen de la glutamina sintetasa, por lo que pueden ser adaptadas a crecer en medios de cultivo con contenido reducido o nulo de este aminoácido, hecho que permite la optimización de medios de cultivo tendiente a reducir la acumulación de subproductos tóxicos como el amonio (Neermann y Wagner, 1996; Christie y Butler, 1994; Butler y Christie, 1994; Hansen y Emborg, 1994; Kurano y col., 1990). La fuente de carbono más frecuentemente utilizada para el cultivo de esta línea es la glucosa. En el caso de que se requiera sustituirla por otra molécula, ésta debe ser también una hexosa, ya que las células CHO en general no son capaces de realizar la gluconeogénesis (Neermann y Wagner, 1996; Altamirano y col., 2000). El ingreso de estos azúcares a la vía glicolítica debe ser, consecuentemente, antes del paso de formación de 6-fosfogluconato, derivado de la glucosa-6-fosfato, la cual conecta la vía glicolítica con el ciclo de las pentosas fosfato, esencial para la síntesis de ácidos nucleicos.

Esta línea celular carece de la enzima funcional α 2,6-sialiltransferasa, que adiciona

las moléculas de ácido siálico terminal a la cadena de oligosacáridos en una unión tipo α 2,6. Esta unión es la que más comúnmente está presente en las glicoproteínas séricas humanas (Schenkle y col., 1997). Debido a esto, el ácido siálico terminal es adicionado exclusivamente en la posición α 2,3- (Savage, 1997; Paulson y col., 1991). Se han obtenido, sin embargo, proteínas con un mayor contenido de ácido siálico terminal mediante la transfección de las células CHO con glicosiltransferasas (Paulson y col., 1991), sialiltransferasas (Schenkle y col., 1997; Fukuta y col., 2000) o con el transportador específico para el ácido siálico acoplado a citidín monofosfato (CMP-NeuNAc, Wong y col., 2006).

Las células CHO son incapaces, asimismo, de sulfatar los residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc), los que son un motivo común a ciertas glicoproteínas, regulando su *clearance in vivo*. Se han aislado, sin embargo, mutantes de esta línea con diferentes características de glicosilación que permiten la expresión de glicoproteínas con una mínima heterogeneidad y similares a las proteínas nativas (Jenkins y Curling, 1994).

1.5. METABOLISMO DE LAS LÍNEAS CELULARES CONTINUAS DE MAMÍFERO (LCCM)

La mayoría de los componentes del medio de cultivo influyen en la cinética celular, regulando las actividades intracelulares y favoreciendo ciertas vías metabólicas en detrimento de otras. Debido a que las LCCm derivan de diferentes especies y diferentes órganos – con funciones muy disímiles entre sí -, aquéllas presentan comportamientos metabólicos, principalmente enzimáticos, muy variables (Schneider y col., 1996). Por esta razón se ha descrito que las concentraciones óptimas de glucosa, glutamina y otros nutrientes varían según la línea celular, y el sistema de cultivo empleado, y deben ser estudiadas en cada caso (Ryu y Lee, 1997). Es posible, sin embargo, encontrar características comunes a la mayoría de las líneas celulares empleadas en la producción industrial de biofármacos para las siguientes especies:

1.5.1. Fuentes de carbono: glucosa, galactosa y manosa

La glucosa es consumida a velocidades muy altas en las líneas celulares continuas de mamíferos (Donnelly y Scheffler, 1976). Neermann y Wagner (1996) estudiaron comparativamente el metabolismo de la glucosa y la glutamina en células BHK, CHO y diferentes líneas de hibridomas, determinando que las velocidades específicas de consumo de glucosa se encontraron siempre cercanas a los valores de actividad específica de la hexoquinasa (HK), la cual en las LCCm se encuentra reducida a aproximadamente un 11%

de su valor original. Esto indicaría que la formación de glucosa-6-fosfato (Glc-6-P) a partir de glucosa, catalizada por la HK, es el paso limitante en la glicólisis (Fig. 1).

Además de la HK, las enzimas fosfofructoquinasa (PFK) y piruvato quinasa (PyrK) serían también responsables por el comportamiento metabólico anormal de las LCCm, como resultado de un proceso de fosforilación reversible causado por proteína quinasa codificadas en uno o más oncogenes activados durante el proceso de establecimiento de las líneas celulares (Wagner, 1997). La baja actividad de la PyrK conduciría a la acumulación de varios intermediarios de la glicólisis, incluyendo la fructosa-6-fosfato (Frc-6-P), lo que probablemente resultaría en el quiebre de la regulación de la PFK. La PFK es normalmente inhibida por ATP y, por lo tanto, está en equilibrio con el flujo de piruvato hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la consecuente generación de ATP. Niveles muy altos de Frc-6-P, sin embargo, anularían el efecto inhibitorio del ATP, perdiéndose la regulación de la glicólisis por la PFK.

Debido a la alta velocidad de producción de ATP a partir de la glicólisis, la relación ATP/ADP en el citosol se incrementa, ocasionando una disminución de la producción de ATP en la mitocondria debido a la reducida concentración de ADP en ella. Como resultado, el potencial transmembrana se eleva y la velocidad de la fosforilación oxidativa disminuye, en tanto aumenta la relación NADH/NAD⁺ en la mitocondria (Williamson y Cooper, 1980), lo que a su vez originaría un aumento importante de la concentración de NADH en el citosol. Sin embargo, la demanda de ATP (originado a partir de la glicólisis) en la célula depende de la presencia de NAD⁺, el cual es regenerado por la reducción de piruvato a lactato. Este defecto metabólico explicaría tanto la alta velocidad de oxidación de la glucosa como la secreción de grandes cantidades de lactato al sobrenadante de cultivo, aún en presencia de niveles de saturación de oxígeno (Reitzer y col., 1979).

De esta manera, la glucosa es fundamentalmente metabolizada vía glicólisis: la mayor parte del esqueleto carbonado de la glucosa fue detectado bajo la forma de lactato, como consecuencia de los conceptos discutidos anteriormente, indicando una gran pérdida de la energía disponible proveniente de este azúcar (Fitzpatrick y col., 1993; Paredes y col., 1998; Petch y Butler, 1994), ya que se generan solamente 2 moles de ATP en el proceso de formación de 2 moles de lactato a partir de 1 mol de glucosa, en lugar de los 36 moles de ATP obtenidos cuando un mol de este azúcar es oxidado a CO₂ y H₂O mediante la secuencia:



En el trabajo ya mencionado, Neermann y Wagner (1996) establecieron también que aproximadamente un 8% de la glucosa utilizada era metabolizada a través del ciclo de las pentosas fosfato (PPC), en tanto 20-30% de ella era destinada a vías diferentes de éstas. Resultados de otros autores apoyan estos datos: 3% de la glucosa sería destinada al PPC y solamente 0,2% ingresaría al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Fitzpatrick y col., 1993).

En células CHO y BHK, y probablemente también debido a alteraciones del metabolismo producidas durante la transformación de las células, no se ha detectado actividad de las enzimas que conectan la glicólisis con el TCA (Fig. 1). Estas enzimas son la piruvato deshidrogenasa (PyrDH), la piruvato carboxilasa (PyrC) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPyrCK) (Irani y col., 1999; Neermann y Wagner, 1996). Tampoco fue posible determinar el ingreso de algún derivado de la glucosa o del piruvato producido hacia el TCA, lo que indicaría que en las LCCm estas vías metabólicas están desvinculadas. Irani y col. (2002) expresaron el gen de la PyrC de *Saccharomyces cerevisiae* en células BHK-21, conectando así la vía glicolítica con el TCA y aumentando la eficiencia de crecimiento celular y la productividad de la rhEPO expresada por estas células. La desconexión de la glicólisis con el TCA, así como una actividad reducida de la lanzadera malato-aspartato que transporta equivalentes de electrones hacia el interior de la mitocondria, serían las causas de la acumulación de lactato en el sobrenadante de cultivo, siendo ésta una vía alternativa para la regeneración de la forma oxidada NAD⁺.

Se ha reportado que la utilización de glucosa como fuente principal de carbono induce el incremento en la concentración de UDP-GNAc (azúcar-nucleótidos), que juegan un papel importante en el control del crecimiento celular y el proceso de glicosilación (ver Capítulo 2). En cambio, cuando se emplea galactosa o manosa en sustitución de la glucosa no se observa este aumento, probablemente debido a la baja velocidad de síntesis intracelular de glucosa a partir de estos azúcares.

Con el fin de optimizar la producción y aprovechamiento de la energía celular, se han utilizado otros azúcares como sustituyentes (totales o parciales) de la glucosa en los medios de cultivo, particularmente fructosa, galactosa y manosa (Marquis y col., 1996). Estos azúcares son metabolizados a una velocidad menor, observándose una actividad reducida de la vía glicolítica que provoca un rendimiento menor de Glc-6-P (Reitzer y col., 1979; Ryll y col., 1994). Este metabolismo reducido produciría menos lactato y un mejor aprovechamiento energético de la glucosa, ya que la Glc-6-P se derivaría principalmente a la continuidad de la glicólisis y el PPC (Schneider y col., 1996), en lugar de hacerlo hacia la síntesis de azúcar-nucleótidos. A bajas concentraciones de glucosa, sin embargo, se

observó un aumento significativo del consumo de glutamina (Martinelle y col., 1998) y, además, cuando la glucosa es sustituida completamente por fructosa o galactosa, la mayor parte de la energía celular deriva de este aminoácido (Schneider y col., 1996; Altamirano y col., 2000). Estas hexosas se incorporan en diferentes niveles de la vía glicolítica, según se presenta en la Fig. 1.

Si bien es posible esperar una velocidad de consumo similar para la glucosa y la galactosa (ya que ambas ingresan a la glicólisis a nivel de la glucosa-6-fosfato), se observa que la velocidad de consumo para la galactosa es significativamente menor que para la glucosa (Altamirano y col., 2000). Los resultados de Plagemann y col. (1981) mostraron para varias LCCm que, a pesar de que la galactosa ingresa a través del mismo transportador que la glucosa, la afinidad de éste por la galactosa es aproximadamente 8 veces menor. En forma análoga, mientras que la alta afinidad de la hexoquinasa por la glucosa deriva en un alto flujo glicolítico, la galactosa es fosforilada lentamente, debido a la baja afinidad de la enzima por este azúcar - aproximadamente 20 veces menor que por la glucosa (Delhotal y col., 1984; Wagner, 1997). Ambos factores – baja velocidad de ingreso al interior de la célula y baja afinidad de la HK para su fosforilación – resultan en un metabolismo reducido de esta hexosa.

En particular, la galactosa se incorpora a la vía glicolítica al fosforilarse por la galactoquinasa y generar galactosa-1-fosfato (Gal-1-P), la cual puede ser transformada a glucosa-6-fosfato (Glc-6-P), un metabolito que conecta la vía catabólica de oxidación de la glucosa con la vía anabólica del PPC. La oxidación de la galactosa, sin embargo, da un rendimiento final de 6 moles de ATP por mol de galactosa, en comparación con los 8 moles obtenidos por mol de glucosa.

Se ha observado en células BHK que la galactosa puede revertir parcialmente el efecto negativo de la privación de glucosa sobre la glicosilación de proteínas recombinantes (Turco, 1980). Por otro lado, Wagner y col. (1991) determinaron que las células TCL 598 (células de un tumor de riñón humano), cultivadas sobre *microcarriers* en medios de cultivo conteniendo glucosa y galactosa, alcanzaron velocidades de crecimiento y densidades celulares máximas similares a las del medio control conteniendo exclusivamente glucosa, observando también que el proceso de muerte celular es más lento en presencia de galactosa que de glucosa. Establecieron también que la galactosa fue metabolizada mucho más lentamente que la glucosa, y que el metabolismo del lactato, del piruvato y de la glutamina de estas células crecidas en el medio con galactosa era diferente al observado en el medio de control.

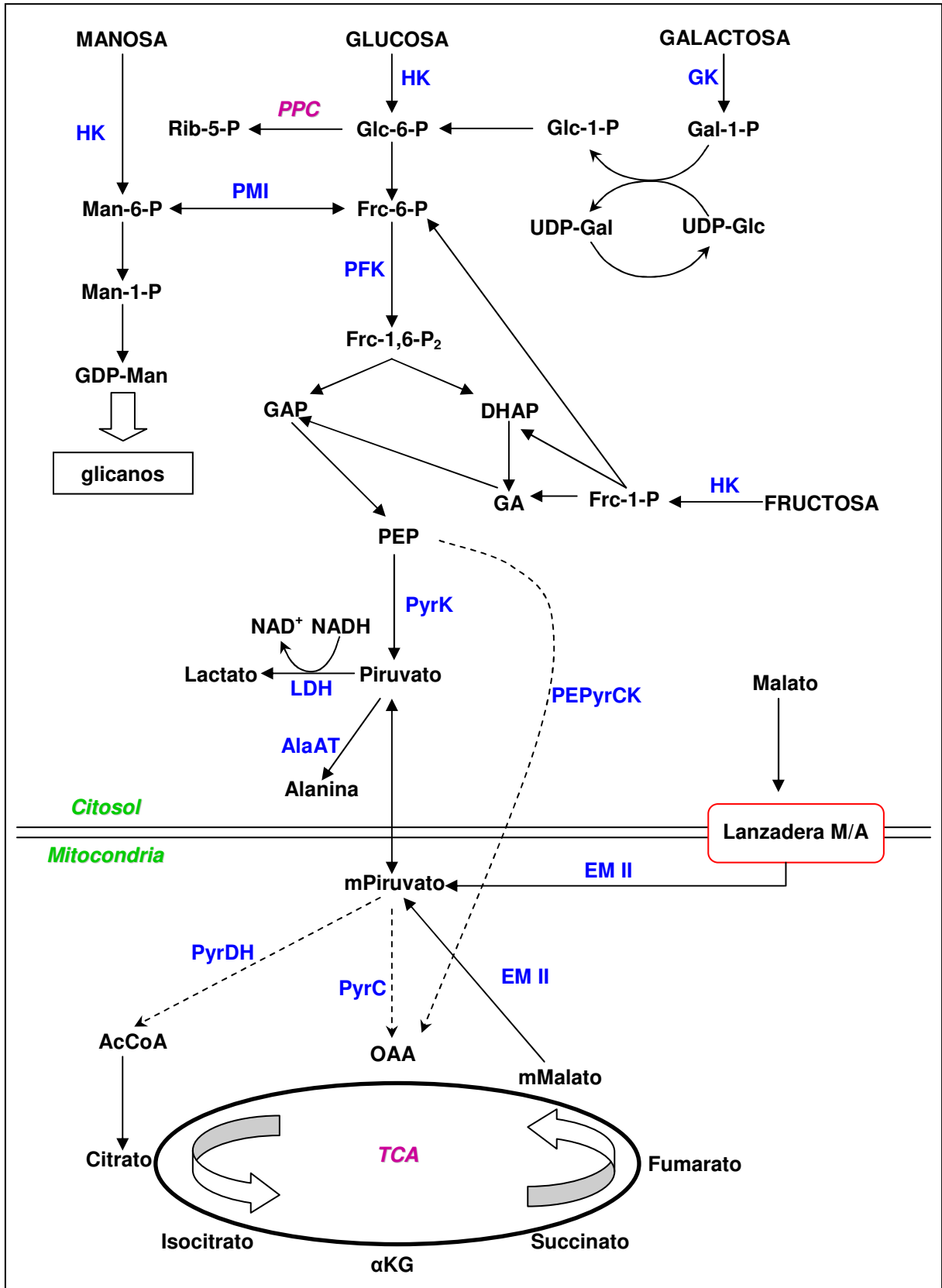


Fig. 1: Esquema de la vía glicolítica en células de mamífero cultivadas *in vitro*. Las líneas de puntos indican las enzimas cuya actividad es prácticamente nula en las LCCm

En las células de mamífero, la manosa que compone las cadenas de oligosacáridos unidas a las proteínas proviene fundamentalmente de la glucosa intracelular (Fig. 1). Esto se debe probablemente a que, a pesar de ingresar a través de los transportadores de glucosa, la concentración de manosa en plasma (30-50 μM) es al menos 100 veces inferior a la concentración de glucosa, por lo que su transporte resultaría prácticamente inhibido por ésta. No obstante, también podría ingresar mediante un transportador específico, aún a bajas concentraciones como se discutirá más adelante. Por otra parte, la manosa puede ser reconvertida a glucosa siguiendo las etapas:



La activación de la manosa requiere su conversión a manosa-6-fosfato (Man-6-P), lo que puede ocurrir mediante dos vías: la fosforilación directa por la HK (Niehues y col., 1998) o por la interconversión de la fructosa-6-fosfato vía la fosfomanosa isomerasa (PMI), la cual conecta la glicólisis con el proceso de glicosilación de las proteínas (DeRossi y col., 2006). La Man-6-P es convertida luego en Man-1-P y ésta, a su vez, en GDP-manosa (GDP-man), el donador de manosa activada más importante en las reacciones de glicosilación.

La privación de glucosa conduce a la síntesis aberrante de los bloques oligosacáridos-lípidos, y a una disminución en la glicosilación de proteínas, así como la síntesis de proteínas relacionadas al estrés, como por ejemplo la GRP78 y la GRP94, que participan del plegamiento de las proteínas en el retículo endoplásmico (Chapman y col., 1998; Rush y col., 2000). A pesar de que las bases fisiológicas de este fenómeno aún no han sido completamente elucidadas, las evidencias apuntan a una deficiencia en la generación de manosa para la síntesis de las glicoproteínas (Panneerselvam y Freeze, 1996a).

Panneerselvam y Freeze (1996b) determinaron que el ingreso de manosa a la célula se realiza a través de dos tipos diferentes de transportadores: en altas concentraciones de manosa, ésta ingresaría mediante el transportador de glucosa GLUT1 (Gould y col., 1991), en tanto propusieron la existencia de un transportador específico de manosa que sería activo aún frente a las bajas concentraciones en que se encuentra este azúcar en plasma. Las experiencias realizadas por estos autores establecieron que este transportador sería específico para manosa, y su constante de afinidad se encontraría en el rango de la concentración fisiológica de este azúcar en plasma, indicando la posibilidad de que la manosa aportada en forma exógena podría suplir una proporción significativa de la

manosa utilizada en la síntesis de glicoproteínas. Este transportador, además, no es inhibido por glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, fucosa, fructosa, N-acetilglucosamina, L-manosa o mio-inositol, y se encontraría en la mayoría de las células de mamífero. En un trabajo posterior, los mismos autores verificaron que al aportar manosa en concentraciones fisiológicas a un cultivo de fibroblastos humanos, las células utilizan el transportador específico de manosa para proveer la mayor parte de este azúcar que es requerido en la síntesis de glicoproteínas (Panneerselvam y col., 1997).

La manosa puede ser convertida en glucógeno, y en general, a altas concentraciones (>5 mM) se metaboliza a nivel celular en forma similar a la glucosa (Dringen y col., 1994). Tradicionalmente se ha considerado que la glucosa provee suficiente manosa para la biosíntesis de glicoproteínas, y que el ingreso de manosa plasmática no debería ser significativo debido a que el exceso de glucosa competiría con ella por el transportador de hexosas. Los resultados de Panneerselvam y Freeze (1996a; 1996b) y de Panneerselvam y col. (1997) cuestionan estas afirmaciones, señalando que la manosa exógena podría ser un precursor significativo, y hasta preferencial, de la síntesis de glicoproteínas. Angata y col. (1999), por otra parte, reportaron un aumento de aproximadamente 50 veces en la síntesis de ácido deaminoneuramínico (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-glicero-D-galactononónico), un miembro de la familia de los ácidos siálicos - junto con el ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc) y el ácido N-glicolilneuramínico (NeuNGc) - que se encuentra ampliamente distribuido en las glicoproteínas y glicolípidos animales, cuando las células productoras son cultivadas en presencia de 20 mM de manosa. De esta forma comprobaron que la síntesis *de novo* del ácido deaminoneuramínico depende directamente del contenido de manosa en el medio de cultivo.

1.5.2. Aminoácidos: glutamina, glutamato y asparagina

Numerosos estudios han establecido que las LCCm utilizan la glutamina como fuente de carbono y nitrógeno en mayor proporción que las células normales, obteniendo entre 30% y hasta 98% de la energía celular a partir de ella (Neermann y Wagner, 1996; Fitzpatrick y col., 1993; Reitzer y col., 1979; Zielke y col., 1984). Se ha demostrado asimismo que la glicólisis se encuentra estrechamente relacionada con la glutaminólisis, observándose que una disminución en los niveles de esta hexosa induce un incremento en la utilización de la glutamina (Sumbilla y col., 1981; Cruz y col., 1998), mientras que, por el contrario, una baja concentración de este aminoácido induce una reducción en la velocidad de consumo de la glucosa (Vriezen y col., 1997). La adición de glutamina, sin embargo, no restaura la normal glicosilación de proteínas producidas en cultivos celulares en los que la glucosa ha sido depletada, como tampoco lo hace el piruvato (Gershman y Robbins, 1981;

Turco, 1980; Baumann y Jahreis, 1983). Además se ha demostrado que en cultivos en quimiostato las células cultivadas en medios con alta concentración de glucosa y glutamina presentan velocidades de consumo de estas especies mucho más altas que las estrictamente requeridas para su metabolismo (Sanfeliu y col., 1997).

La glutamina interviene en la biosíntesis de purinas, pirimidinas y aminoazúcares, entre otros metabolitos. El catabolismo de la glutamina tiene lugar principalmente en la matriz mitocondrial, con la remoción inicial del grupo amido para dar glutamato y amonio, en una reacción catalizada por la glutaminasa. El grupo amido liberado puede utilizarse como donador del grupo amino para ciertas enzimas biosintéticas (especialmente de las vías biosintéticas de purinas y pirimidinas, y aminoazúcares activados), aunque estas reacciones ocurren en baja proporción. El segundo paso es la remoción del grupo α -amino del glutamato generado, para dar α -cetoglutarato. Esta reacción puede ser catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH) - resultando en la liberación de una segunda molécula de amonio - o vía una aminotransferasa, que transfiere el grupo amino a un α -cetoácido, generalmente piruvato u oxaloacetato, para formar alanina o aspartato, respectivamente. La glutamina también puede generar α -cetoglutarato mediante una reacción de transaminación vía la glutámico-pirúvico transaminasa (Kurano y col., 1990), el cual ingresa finalmente al TCA.

Estas reacciones permiten la generación de suficientes equivalentes reducidos y ATP, a través de diferentes vías metabólicas (Fig. 2), cada una de las cuales produce diferentes cantidades de energía. La oxidación completa de la glutamina produce 24 a 27 moles de ATP por mol de glutamina, en tanto que la generación de lactato, alanina o aspartato como productos finales rinde 9 moles de ATP por mol de glutamina, bajo la forma de diferentes cantidades de ATP o de NADH (Glacken, 1988; Häggström, 1991). La generación de los diferentes productos tiene distintas consecuencias sobre la célula: en tanto la acumulación de lactato inhibe el crecimiento celular, el aspartato no lo hace (Glacken, 1988). La alanina secretada al medio como consecuencia de la glutaminólisis, por otra parte, puede ser re-metabolizada por las células si la concentración de glutamina es inferior a 1,5 mM (Wagner y col., 1988). La proporción de ATP derivado de la oxidación de la glutamina varía entre las líneas celulares, y depende de las condiciones del entorno celular (Wagner, 1997).

Con el objetivo de disminuir la formación de amonio, un subproducto tóxico del metabolismo celular que se genera a partir de la glutamina y se acumula en los cultivos de LCCm, se ha utilizado glutamato (Butler y Christie, 1994; Altamirano y col., 2001a, 2001b, 2004), y asparagina (Kurano y col., 1990), entre varias otras especies, como sustitutos de la

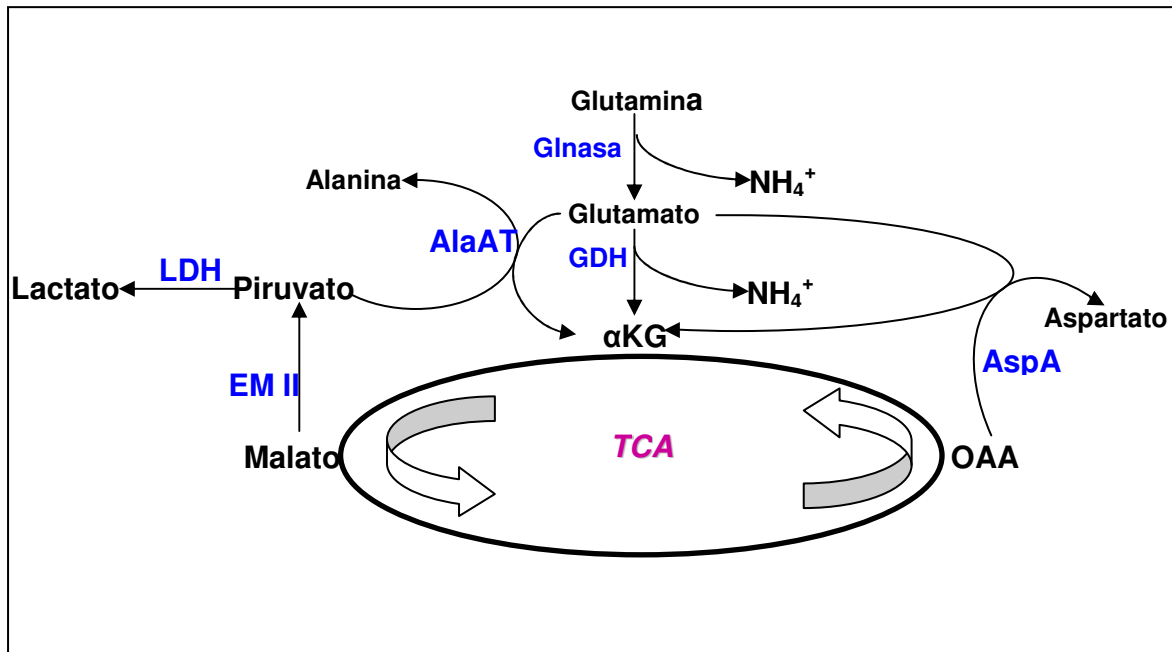


Fig. 2: Esquema de la glutaminólisis: incorporación de la glutamina al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en células de mamífero cultivadas *in vitro*.

glutamina. Esta sustitución es factible, ya que los resultados obtenidos por Street y col. (1993) mostraron una alta actividad de la glutamina sintetasa en células CHO cuando éstas eran cultivadas en ausencia de glutamina.

La flexibilidad del metabolismo celular se verifica al observar que, además de utilizar el glutamato como precursor de la síntesis de otros aminoácidos, las células de mamífero pueden sintetizar glutamato, el cual se acumula en el sobrenadante a lo largo del tiempo de cultivo (Miller y Blanch, 1991; Reitzer y col., 1979). En experimentos en los que se adicionó amonio marcado radioactivamente al cultivo de células CHO en presencia de glutamina, se observó que parte del nitrógeno se incorporaba a glutamato y alanina, indicando la formación de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato, en una reacción catalizada por la GDH (Street y col., 1993).

Mediante la utilización de inhibidores específicos de la glutaminasa y de transaminasas, otros autores demostraron, por otro lado, que el glutamato producido por la hidrólisis de la glutamina es principalmente catabolizado vía transaminación, más que por la vía de la glutamato deshidrogenasa, la cual es el principal camino metabólico seguido por este aminoácido en mitocondrias de células normales (Matsuno y col., 1986). Los experimentos de Street y col. (1993) con marcación radioactiva, confirman estas observaciones, ya que estos autores observaron que 35%-50% de la alanina presente en el

medio de cultivo provenía de la transaminación del glutamato, indicando que éste es metabolizado preferencialmente por transaminación antes que por la desaminación oxidativa catalizada por la GDH. La actividad de esta enzima podría estar así regulada por la concentración de amonio del medio (Schneider y col., 1996). Se ha demostrado, por otro lado, que la actividad de la GDH está regulada alostéricamente por GDP y ADP: la inhibición de su actividad frente a altas concentraciones de ATP y GTP indica que esta enzima es activada cuando la célula requiere de aminoácidos o moléculas similares para la producción de energía, como por ejemplo glutamina, prolina y ornitina, las cuales se obtienen a partir del glutamato (Doverskog y col., 1997). Cuando se cultivaron células CHO en un medio de cultivo en el cual la glutamina fue sustituida por glutamato, y en condiciones de baja concentración de glucosa, se verificó que la mayor parte del ATP producido a partir del metabolismo del glutamato (78%-94%) era generado por la desaminación de éste a α -cetoglutarato (reacción de oxidación catalizada por la GDH, y energéticamente más eficiente que la transaminación), en tanto el resto provenía de la transaminación del glutamato a alanina (Altamirano y col., 2001b).

Las ventajas que ofrece el glutamato como sustituto de la glutamina son fundamentalmente:

- Su estabilidad térmica, que impide su descomposición espontánea en el medio de cultivo con la consecuente generación de amonio.
- La posibilidad de obtener glutamina, por acción de la glutamina sintetasa, presente en varias líneas celulares incluyendo las células CHO.
- La presencia de un único grupo amino, lo que le da un carácter menos amoniogénico que la glutamina.

Esta sustitución, sin embargo, puede requerir de un tiempo de adaptación de las células al crecimiento en medios de cultivo libres de glutamina, durante el cual se incrementa la actividad de la glutamina sintetasa y la velocidad de transporte del glutamato (Butler y Christie, 1994; Christie y Butler, 1999), o puede no ser viable, ya que no todas las líneas celulares pudieron ser adaptadas a crecer en presencia de glutamato en lugar de glutamina, según observaron McDermott y Butler (1993). Estos autores propusieron que el ingreso del glutamato – cuya carga neta dificulta su pasaje a través de las membranas celulares –, y no la actividad de la glutamina sintetasa, es el responsable por la capacidad de una determinada línea celular de crecer en un medio libre de glutamina.

Las experiencias de Christie y Butler (1999) mostraron que la sustitución de la glutamina por glutamato en cultivos de células BHK-21 permitió obtener un medio de cultivo térmicamente estable, pero inadecuado para mantener una producción celular equivalente al

cultivo control. Sin embargo, la suplementación de este medio con asparagina 3 mM y una concentración baja de glutamina (0,5 mM) restauró la capacidad de crecimiento originalmente observada para estas células, obteniéndose luego de la adaptación un aumento en la producción celular asociada a una disminución en la acumulación de amonio, comparado con el cultivo control con glutamina.

Con respecto a la utilización de asparagina, otros estudios han demostrado que tanto ésta como la glutamina inhiben la actividad glicolítica en células tumorales presentes en ascitis, a la vez que contribuyen a mantener altos niveles de adenilatos, mediante la estimulación de la síntesis *de novo* de purinas (González-Mateos y col., 1993). Se ha reportado también que la depleción de ambos aminoácidos, glutamina y asparagina, induce una mayor actividad proteolítica en el sobrenadante de cultivo (Yang y Butler, 2000b).

Por otra parte, Kurano y col. (1990) estudiaron la estabilidad de la glutamina y la asparagina en medio MEM- α al 10% (v/v) SFB, a 37°C y 5% CO₂, determinando que luego de una semana en estas condiciones, un 6,5% de la asparagina había desaparecido del medio (generándose una proporción igual de aspartato), comparado con el 28,5% de disminución en la concentración inicial de glutamina. La aparición de una cantidad equivalente de aspartato sugeriría que la asparagina disminuye como consecuencia de la acción de la asparaginasa presente en el suero fetal bovino. El leve incremento observado en la concentración de glutamato indicaría que la glutaminasa del suero sería responsable solamente por un 10% de la glutamina degradada, y que el resto de este aminoácido se descompondría térmicamente. Estos resultados indican que la asparagina es estable aún en presencia de SFB en el medio de cultivo, y en consecuencia, menos amoniogénica que la glutamina y, por lo tanto, que resulta una alternativa para ser utilizada como sustituyente de esta última.

Se ha reportado, por otra parte, que numerosas líneas celulares muestran altas velocidades de consumo de asparagina, entre otros aminoácidos (Miller y Blanch, 1991). Si bien no es considerado un aminoácido esencial para las células CHO, Castro y col. (1995) determinaron velocidades de consumo de asparagina muy altas en esta línea celular. Esto podría deberse a que las células incorporan estos compuestos directamente del medio de cultivo sin tener que destinar energía metabólica a su síntesis, lo cual tendría un impacto beneficioso sobre el crecimiento celular (Altamirano y col., 2006b).

La asparagina ha sido utilizada como agente protector frente al estrés causado por hiperosmolalidad y acidificación del pH intracelular debido a una alta presión de CO₂, verificándose que su adición al medio no incrementa el flujo glicolítico – en consonancia con los resultados presentados por González-Mateos y col. (1993) – y permite mejorar el

rendimiento celular con respecto al cultivo control con glutamina (deZengotita y col., 2002a). Las experiencias de Altamirano y col. (2006b) mostraron que la adición de asparagina al medio de cultivo, aún en la presencia de glutamina, es necesaria para obtener alta productividad y calidad biológica del t-PA producido en células CHO.

1.5.3. Productos del catabolismo: lactato y amonio

El análisis de flujos metabólicos en células BHK mostró velocidades de glicólisis muy similares a las velocidades de formación de lactato (Neermann y Wagner, 1996). Debido a la reducida actividad de las enzimas PEPyrCK, PyrDH y PyrC ya descrita anteriormente, la producción de lactato depende entonces del consumo de la glucosa, indicando que la mayor parte de la energía metabólica del azúcar se desperdicia en este proceso. A muy bajas concentraciones de glucosa, el rendimiento de ésta en lactato disminuye sustancialmente, indicando un cambio en el metabolismo hacia un menor consumo del azúcar (Cruz y col., 1998).

Se ha determinado por experiencias con marcación radioactiva que las líneas celulares continuas de mamífero producen lactato a partir de otras especies además de la glucosa, como por ejemplo la glutamina. Zielke y col. (1980) demostraron que hasta un 13% del lactato producido provenía del consumo de este aminoácido. Esto ocurriría a partir de la conversión (en varias etapas) de la glutamina en malato, en el TCA (Fig. 2), el cual originaría piruvato mediante la enzima málica tipo II de localización mitocondrial (Sauer y col., 1980). El piruvato así producido atravesaría la membrana de la mitocondria, pasando al citosol, en donde se convertiría en lactato por acción de la lactato deshidrogenasa. Otros estudios, sin embargo, contradicen esta teoría. En efecto, Moreadith y Lehninger (1984) propusieron que la enzima málica tipo II utiliza preferencialmente malato extramitocondrial para producir piruvato, el cual origina a su vez lactato luego de pasar al citosol.

Cuando se exceden niveles críticos, el lactato ejerce un efecto perjudicial sobre las células (Reuveny y col., 1986), particularmente causado por la reducción – en algunos casos drástica – del pH del cultivo debido a su condición de ácido débil. En la Tabla II se presentan datos sobre la influencia de diferentes concentraciones de este metabolito sobre el crecimiento y la productividad celulares. En general, no se observan efectos negativos con concentraciones inferiores a 20 mM (Miller y col., 1988).

Se ha propuesto la utilización de un bajo contenido de glucosa (<1,5 mM) como estrategia para mantener bajos niveles de lactato en el cultivo (Cruz y col., 1998; Zhou y col., 1995, Glacken y col., 1986).

Tabla II: Influencia de diferentes concentraciones de lactato sobre el crecimiento celular a pH constante (adaptado de Wagner, 1997).

Concentración de lactato	Crecimiento celular	Productividad celular	Referencia
<20 mM	sin efecto	sin efecto	Wagner y col., 1988 Miller y col., 1988
20-40 mM	sin efecto	inhibida	Glacken y col., 1988
40-60 mM	levemente inhibido	inhibida	Glacken y col., 1988
>60 mM	inhibido	inhibida	Glacken y col., 1988

Otro metabolito de gran importancia desde el punto de vista tecnológico es el ion amonio. La acumulación de iones amonio durante los cultivos es una de las principales causas de la inhibición del crecimiento celular (Newland y col., 1990), si bien diferentes líneas celulares muestran distintos grados de tolerancia a este ion (Hassell y col., 1991). Este hecho se debe probablemente a que en las LCCm se expresan diferentes isoenzimas de la glucosamina-isomerasa, las cuales poseen distintos valores de K_M para el amonio (Ryll y col., 1994). Diferentes estudios realizados con la misma línea celular también han presentado resultados dispares, probablemente debido a las condiciones de cultivo y a la “historia” particular del clon empleado (Schneider y col., 1996).

Se ha establecido que la velocidad de crecimiento y la productividad de las células animales utilizadas para la producción de fármacos se reducen cuando este catabolito se acumula en el sobrenadante de cultivo (Hansen y Emborg, 1994; Backer y col., 1988; Butler y Spier, 1984; Glacken, 1988; Ito y MacLimans, 1981) y que la calidad del producto sintetizado – particularmente la expresión de carbohidratos y el proceso de sialidación –, puede resultar alterada aún en presencia de concentraciones tan bajas como 2 mM (Andersen y Goochee, 1995; Yang y Butler, 2000a, 2000c; Thorens y Vassalli, 1986; Borys y col., 1993, 1994). Por ese motivo se han estudiado numerosas opciones para disminuir la acumulación de este ion en el sobrenadante de cultivo, ya sea mediante la remoción el amonio acumulado o la reducción de su formación metabólica.

El amonio acumulado en el sobrenadante de cultivo de células animales proviene de dos vías diferentes, ambas involucrando la glutamina: una de estas vías resulta de la descomposición térmica del aminoácido componente del medio de cultivo, para generar ácido pirrolidón carboxílico y NH_3 (Ozturk y Palsson, 1990; Trisch y Moore, 1962), en una reacción intramolecular tipo $\text{S}_{\text{N}2}$, que sigue una cinética de primer orden. El ácido pirrolidón carboxílico generado no es metabolizado, probablemente, y no se verifican efectos tóxicos asociados al mismo, al menos en las concentraciones que pueden llegar a acumularse

normalmente en el medio de cultivo. Schneider y col. (1996) presentan una amplia revisión de la cinética de descomposición de la glutamina en diferentes medios y condiciones, relevando datos que indican una vida media de la glutamina entre 3 y 17 días. La velocidad de descomposición de este aminoácido depende de la temperatura y pH del medio, así como de la concentración de SFB (Ozturk y Palsson, 1990), por lo que la extensión de esta reacción debe ser determinada para cada medio de cultivo en particular y bajo las condiciones operacionales reales (Schneider y col., 1996).

La segunda vía de acumulación de amonio se deriva del metabolismo de la glutamina, la cual es desaminada por la glutaminasa para generar glutamato, y la posterior desaminación de este último por acción de la GDH, originando α -cetoglutarato (Fig. 2).

Varios estudios han determinado que concentraciones fácilmente alcanzables en cultivos por lote de células de mamífero (1 a 5 mM de amonio) reducen la velocidad de crecimiento celular (Butler y Spier, 1984; Ozturk y col., 1992). La sensibilidad a este metabolito, por otra parte, varía entre las diferentes líneas celulares, dependiendo además de la concentración de suero, la composición del medio de cultivo y el sistema de cultivo empleado (Kurano y col., 1990; Gawlitzek y col., 1998). El efecto de diferentes concentraciones alcanzadas en el cultivo sobre el crecimiento y productividad celulares se resume en la Tabla III.

Tabla III: Influencia de diferentes concentraciones de amonio sobre el crecimiento y productividad celulares (adaptado de Wagner, 1997).

Concentración de amonio	Crecimiento celular	Productividad celular	Referencia
<2 mM	sin efecto	sin efecto*	Glacken y col., 1988
2-5 mM	inhibido	sin efecto*	Glacken y col., 1988 McQueen y Bailey, 1990a Newland y col., 1990
>5 mM	inhibido	inhibida	Glacken y col., 1988

* Sin considerar posibles alteraciones del perfil de glicosilación.

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción para explicar el efecto tóxico del amonio sobre el metabolismo celular:

- El amonio induciría una reducción del pH intracelular (Goochee y Monica, 1990; McQueen y Bailey, 1990b; Maoirella, 1992), que alteraría la actividad de enzimas altamente sensibles al pH, como por ejemplo la PFK.

- El amonio competiría con los iones potasio para su ingreso a través de la membrana plasmática mediante las proteínas transportadoras de potasio, como por ejemplo la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , lo que originaría un aumento crítico de la demanda de energía para poder mantener los gradientes iónicos transmembrana (Martinelle y Häggström, 1993).
- La disminución de la síntesis de intermediarios del TCA, especialmente α -cetoglutarato a partir de la desaminación del glutamato, una reacción altamente influenciada por su producto, el amonio (Doyle y Butler, 1990).
- El aumento del *pool* intracelular de azúcares activados UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc (Ryll y col., 1994), lo que reduciría la disponibilidad de UTP para otros procesos metabólicos.
- La disminución en la eficiencia metabólica causada por la excreción forzada de metabolitos intermediarios potencialmente valiosos, como la alanina, con el fin de detoxificar el amonio (Schneider y col., 1996).
- La aparición de un compuesto tóxico no determinado (McQueen y Bailey, 1990a).

Es posible que todos ellos afecten en diferente medida al metabolismo celular, generando las alteraciones observadas.

Se han propuesto asimismo diferentes estrategias para disminuir los niveles de amonio acumulados en el medio de cultivo, como por ejemplo la utilización de un bajo contenido de glutamina (<1,0 mM) (Glacken y col., 1986) o la sustitución de este aminoácido por otros compuestos menos amoniogénicos, como glutamato (Butler y Christie, 1994), asparagina (Hansen y Emborg, 1994; Kurano y col., 1990), piruvato (Genzel y col., 2005) y dipéptidos como la alanina-glutamina y la glicina-glutamina (Christie y Butler, 1999), con diferentes resultados. También ha sido evaluada la estrategia de sobreexpresar el gen de la glutamina sintetasa, por ejemplo por exposición a la metionina sulfoximina, o introducir múltiples copias de este gen con el fin de obtener una línea celular autotrófica para la glutamina, eliminando así la demanda de un aporte exógeno de este aminoácido y disminuyendo consecuentemente la acumulación extracelular de amonio.

1.6. PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL CULTIVO DE LAS LCCM

Ciertos parámetros físicoquímicos del cultivo, como el valor de pO_2 , la temperatura, el pH y la osmolalidad del medio pueden afectar las velocidades de crecimiento y producción celulares.

1.6.1. Oxígeno

Para la mayoría de las líneas celulares el nivel óptimo de oxígeno disuelto (normalmente citado en la bibliografía como *dissolved oxygen*, DO) se encuentra en el rango de 25%-50% de saturación con aire (Dunster y col., 1997; Jan y col., 1997), aunque también se ha verificado que el crecimiento celular es posible a muy baja tensión de oxígeno (Ozturk y Palsson, 1990). En las células de mamífero, el consumo de O₂ varía entre 0,04 y 0,6 x 10⁻¹² mol cél.⁻¹ h⁻¹, que son valores muy bajos comparados con los microorganismos (Tokashiki y Yokoyama, 1997). Sin embargo, a pesar de tratarse de valores menores, la oxigenación de cultivos de alta densidad y/o grandes volúmenes de suspensión celular es un problema importante en procesos productivos a escala industrial, debido a dos razones. En primer lugar, la baja solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo (6-7 mg l⁻¹ a 37°C), y por otro lado, por la sensibilidad de las células de mamífero a los esfuerzos de corte, lo que dificulta el uso de la aireación directa (burbujeo de aire al medio de cultivo).

Una baja tensión de oxígeno induce a una mayor utilización de la glucosa para la producción de energía, lo que incrementa el flujo glicolítico (Ozturk y Palsson, 1990) y puede afectar el crecimiento y productividad celulares, así como la glicosilación de las proteínas (Restelli y col., 2006). Por otra parte, a altas concentraciones de oxígeno se ve aumentada la formación de especies reactivas del mismo – fundamentalmente el ion superóxido y peróxido de hidrógeno –, que dañan las membranas celulares al oxidar sus lípidos, alteran la actividad enzimática y atacan tanto las bases como los azúcares de los ácidos nucleicos (Shigenaga y col., 1994), lo que induce un menor crecimiento. A pesar de ello, algunas células de mamífero han sido adaptadas a condiciones de hiperoxia mediante la inducción de enzimas antioxidantes (Jan y col., 1997).

La productividad específica celular también depende de los niveles de DO, si bien se encuentran en la bibliografía resultados opuestos: la máxima productividad específica se observó a concentraciones de DO más altas (Ogawa y col., 1992), más bajas (Phillips y col., 1987) o iguales (Ozturk y Palsson, 1990) que la concentración óptima para el crecimiento celular. Esto puede explicarse por las diferencias en los sistemas de enzimas antioxidantes específicos de cada línea celular, en la composición del medio de cultivo y el sistema de cultivo empleado. De igual manera la concentración de DO puede afectar la glicosilación de las proteínas, si bien el grado de este efecto dependerá también de las variables mencionadas (Kunkel y col., 1998; Chotigeat y col., 1994; Restelli y Butler, 2002).

En particular, Restelli y col. (2006) estudiaron el efecto de la concentración de DO sobre la producción y glicosilación de la rhEPO producida en células CHO, determinando que en un amplio rango de concentraciones de DO (3% a 100%) fue posible obtener un

crecimiento máximo, mientras que la productividad de la proteína se vio reducida en condiciones de muy baja (3%) o muy alta (200%) tensión de O₂. El perfil de glicosilación de la rhEPO no se vio significativamente afectado por la concentración de DO, indicando que la maquinaria de glicosilación de esta línea celular en particular es extremadamente tolerante a los cambios en esta variable.

1.6.2. Temperatura

La temperatura normal de crecimiento de las células de mamífero es de 37°C: en general, a esta temperatura las células crecen exponencialmente y los valores de consumo de glucosa y producción de lactato se incrementan en forma continua. La reducción de la temperatura a valores entre 30° y 35°C induce una disminución de estas velocidades metabólicas, pudiendo o no afectar la proliferación celular (Ducommun y col., 2002; Hendrick y col., 2001; Yoon y col., 2003a). El efecto beneficioso de una baja temperatura de cultivo sobre la productividad específica de las proteínas parece ser, sin embargo, específico para cada línea celular en particular, ya que se ha reportado una productividad mayor (Hendrick y col., 2001; Schatz y col., 2003; Yoon y col., 2003a), menor o igual (Ryll y col., 2000; Yoon y col., 2003b) a la obtenida cuando las células se cultivan a 37°C.

Yoon y col. (2005) estudiaron el metabolismo, productividad y patrón de glicosilación de la rhEPO producida en modo *batch* en células CHO a diferentes valores de pH – 6,85; 7,00; 7,20; 7,40; 7,60 y 7,80 – cuando se cultivan las células a dos temperaturas diferentes (32,5°C y 37°C). Tanto q_{glc} como q_{lac} disminuyeron al bajar la temperatura, lo que concuerda con datos reportados con otras líneas CHO (Bollatti Fogolín y col., 2004). Los valores de velocidad específica de producción de esta proteína (q_{rhEPO}) y la proporción de isoformas ácidas se mantuvieron relativamente constantes a 37°C para todo el espectro de valores de pH estudiado, mientras que a 32,5°C se verificó una fuerte dependencia de la q_{rhEPO} con el pH del cultivo, y una proporción ligeramente mayor de isoformas ácidas, probablemente debido a una disminución en la actividad de las glicosidasas presentes en el sobrenadante.

En otro estudio sobre el efecto de la temperatura en la producción de rhEPO en células CHO se observó que la aplicación de un *shock* térmico sobre estas células induce un aumento en la acumulación de amonio durante la fase de crecimiento, al mismo tiempo que una reducción en la producción de la glicoproteína (Tsao y col., 1992).

1.6.3. pH

El cultivo de células de mamífero se realiza, idealmente, en un rango de pH entre

7,0 y 7,2 (deZengotita y col., 2002b). El pH del cultivo es un parámetro que debe ser cuidadosamente monitoreado para asegurar la calidad del producto de interés, ya que se ha demostrado que puede afectar tanto la velocidad de expresión así como su glicosilación (Borys y col., 1993, 1994; Zanghi y col., 1999). En los cultivos de células de mamífero se utiliza generalmente el sistema $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$, mantenido a través de la aplicación de 5% CO_2 al medio de cultivo, como regulador del pH. Se emplea también el buffer HEPES, aunque su uso es restringido a escala industrial por causa de su alto costo.

La influencia del pH sobre los distintos procesos metabólicos y su interacción con otros factores aún se encuentra en estudio. Se ha demostrado, por ejemplo, que a pH 8 el amonio causa una significativa inhibición de la glicosilación del lactógeno-I placentario murino producido en células CHO, mientras que a pH 7,2 esta inhibición es leve (Borys y col., 1994).

Los resultados obtenidos por Yoon y col. (2005) para la producción de rhEPO en células CHO demostraron que el pH afecta significativamente el crecimiento de estas células (en términos de la velocidad específica de crecimiento y la densidad celular máxima alcanzada) así como la viabilidad del cultivo a las temperaturas estudiadas (32,5 °C y 37 °C). Establecieron además que q_{glc} y q_{lac} , así como también el rendimiento de lactato a partir de glucosa ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$), disminuyen al aumentar el pH del medio. Las diferencias encontradas entre el trabajo de estos autores y los resultados informados por otros (Borys y col., 1993, 1994; Kurano y col., 1990) sugieren que el pH óptimo para el crecimiento celular y la productividad específica varía entre las diferentes líneas de células CHO utilizadas y debe ser optimizado en cada caso.

1.6.4. Osmolalidad

La osmolalidad es una expresión del número total de partículas osmóticamente activas de soluto disueltas en un kilogramo de solvente puro, y es independiente del tamaño de la partícula, su densidad, configuración o carga eléctrica. En el caso de los fluidos biológicos tanto como los medios de cultivo, el solvente es el agua: 1 mOsm kg^{-1} H_2O a 38°C es equivalente a una presión osmótica de 19 mm de mercurio. La expresión mOsm kg^{-1} debe leerse como *miliosmoles por kilogramo*, encontrándose también en la literatura la expresión mOs kg^{-1} .

Por ejemplo, en una solución 1 molal de NaCl teóricamente se encuentran presentes un mol de iones Na^+ y un mol de iones Cl^- por kilogramo de solvente puro. Estrictamente, una solución 1 molal de NaCl tiene una osmolalidad ligeramente inferior a 2 mOsm kg^{-1} , debido a la atracción mutua residual entre los iones hidratados. El efecto de

este fenómeno (que se da también entre moléculas no cargadas) varía de forma no lineal en función de la concentración de soluto, y por esta razón no es válido medir la osmolalidad de una solución diluida y multiplicarla por la inversa de la dilución para obtener la osmolalidad de la solución original.

Es posible encontrar en la bibliografía datos sobre el efecto de la osmolalidad en el crecimiento de las células de mamífero y la producción de polipéptidos (Ozturk y Palsson, 1991; García-Perez y col., 1989; Miner y col., 1981; Mainwaring y Wayte, 2005). La osmolalidad óptima del medio de cultivo para el crecimiento de células de mamífero oscila entre 260 y 330 mOsm kg⁻¹ (Ozturk y Palsson, 1991; Ryu y Lee, 1997, 1999), y se consigue mediante la adición de NaCl u otras especies, generalmente aminoácidos, al medio.

En cultivos de hibridomas se ha observado que el aumento de la osmolalidad del medio induce la reducción de la velocidad específica de crecimiento, en tanto se verifica un aumento en el proceso de apoptosis, y en las velocidades específicas de consumo de glutamina y de producción de anticuerpos (deZengotita y col., 2002b). Este aumento en el consumo de glutamina, así como de otros aminoácidos, había sido previamente observado por Oh y col. (1995), quienes propusieron que se debe a un mecanismo de defensa celular para contrarrestar el *shock* osmótico. De acuerdo con los datos reportados, este parámetro no mostró tener un efecto significativo sobre el flujo glicolítico y el pH intracelular. El incremento en la productividad, por otro lado, coincide con lo indicado por Etcheverry y Ryll (1998), sobre el efecto que un entorno desfavorable – por ejemplo, la existencia de estrés osmótico – produce sobre las células.

1.7. GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE USO TERAPÉUTICO. FACTORES QUE LA AFECTAN.

La mayoría de las proteínas secretadas por células de mamífero, incluyendo muchas proteínas de importancia farmacológica, son glicoproteínas en su estado natural. El contenido de carbohidratos varía desde un 3% de su peso (como en la inmunoglobulina G) hasta más del 40% (como en la eritropoyetina), y requieren de la glicosilación para su completa eficacia *in vivo*. Aún más, el perfil terapéutico de un polipéptido administrado resulta fuertemente influenciado por su glicosilación. En consecuencia, en el diseño de una proteína para ser usada en un tratamiento en salud humana es esencial que su estructura se asemeje en la mayor medida posible a la del producto natural, por lo que resulta imperioso lograr una correcta glicosilación. Hasta la fecha, se ha clonado y expresado en células heterólogas un número significativo de glicoproteínas de importancia terapéutica, y

muchos de estos productos están hoy disponibles comercialmente.

La adición de carbohidratos a las proteínas, o *glicosilación*, es un evento co- y pos-traducciona que resulta en la adición de cadenas de azúcares de longitud y ramificación variable a aminoácidos específicos. En contraste con la secuencia de aminoácidos de la porción proteica, las estructuras de carbohidratos son variables, un hecho conocido como *microheterogeneidad*. La microheterogeneidad de las glicoproteínas es consecuencia de que la síntesis de carbohidratos no es dirigida por un modelo o templado - como sí ocurre con la secuencia de aminoácidos -, y refleja la naturaleza diferente y el variado grado de expresión de las glicosiltransferasas asociados a cada célula hospedera (Goochee, 1992; Gawlitzek y col., 1998). La glicosilación, por el contrario, es un proceso controlado exclusivamente por la célula - se han clonado más de 25 enzimas con actividad glicosiltransferasa (Savage, 1997) -, y se ve influenciada por numerosos factores, como se describirá más adelante.

En las células de mamífero los oligosacáridos se asocian covalentemente a la proteína mediante dos tipos de unión: la unión tipo *N-link*, en la cual una molécula de GlcNAc se une a un residuo Asn, y la unión tipo *O-link*, en la cual una molécula de GalNAc, GlcNAc, fucosa o xilosa se une a un residuo Ser o Thr. Una determinada proteína expresada en estas células puede presentar uno o los dos tipos de unión de los oligosacáridos. Se ha estudiado ya la importancia de la glicosilación en el plegamiento de las proteínas (Helenius, 1994), su ensamblado y exportación (Varki, 1993; Fiedler y Simmons, 1995), sin que la base molecular de estos procesos haya sido aún completamente dilucidada (Ermonval y col., 2000).

Si bien las regiones adyacentes de las uniones tipo *O-link* son mucho menos conservadas que las asociadas a las uniones *N-link*, en las células de mamífero recombinantes frecuentemente se encuentra un *core* relativamente constante (Fig. 3a). Los oligosacáridos *N-linked* presentan un *core* pentasacárido (Fig. 3b), el cual se ramifica mediante la unión de sucesivas unidades Gal β 1-4GlcNAc, denominadas *unidades N-acetil-lactosamina*, dando origen a estructuras di-, tri-, tetra- o penta-antenarias.

Las cadenas laterales de hidratos de carbono presentes en las glicoproteínas frecuentemente influyen sobre sus propiedades bioquímicas y biológicas, como la velocidad de *clearance* plasmático, inmunogenicidad, secreción, actividad biológica, antigenicidad y sensibilidad a la desnaturalización térmica, entre otras (Wittwer y Howard, 1990; Goochee y Monica, 1990), así como la interacción intramolecular entre las porciones de la proteína, originando su conformación tridimensional característica (Hart, 1992; Gooche y col., 1991; Parekh, 1991). Resulta particularmente importante la presencia de la molécula de ácido

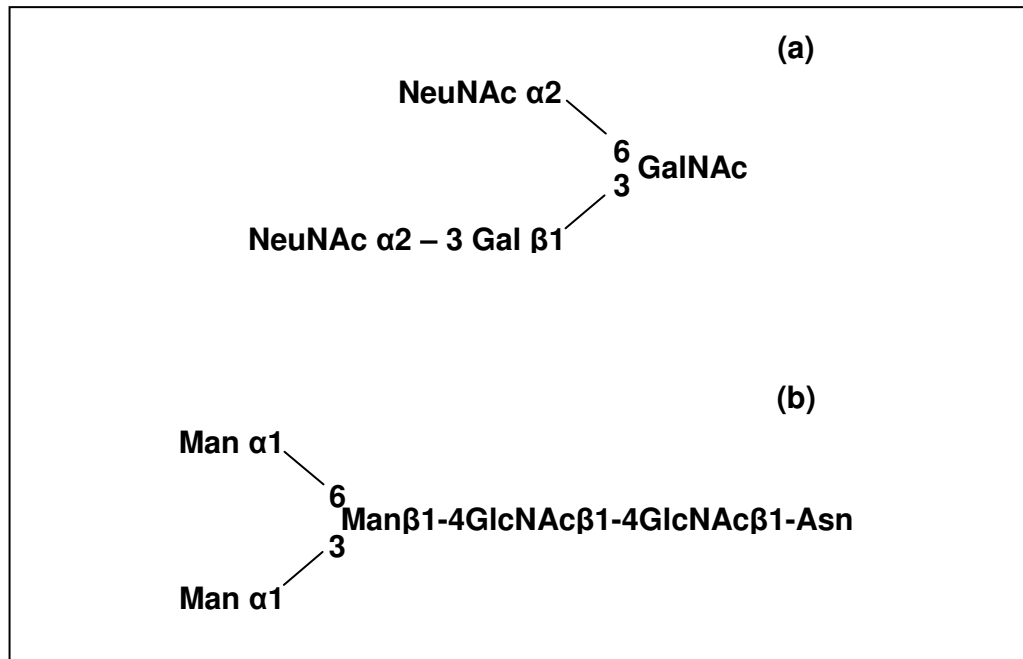


Fig. 3: Esquema de la glutaminólisis: incorporación de la glutamina al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en células de mamífero cultivadas *in vitro*.

siálico terminal en las cadenas de oligosacáridos unidas al esqueleto aminoacídico, ya que se ha demostrado que afecta especialmente la absorción, la vida media y el *clearance* en suero, así como las propiedades físicas, químicas e inmunogénicas de la glicoproteína (Parekh, 1991; Varki, 1993; Goochee y col., 1991; Kobata, 1992).

Son varias las razones por las que los oligosacáridos realizan todas esas funciones. En primer lugar, la enorme diversidad de su estructura primaria comparada con la de péptidos o ácidos nucleicos, basada en las diferencias entre los monosacáridos que los componen y la posición variable en que pueden ser unidos, sus configuraciones anoméricas, la formación de cadenas lineales o ramificadas y la posibilidad de sustitución con otros grupos químicos. Por otro lado, y debido a su localización generalmente externa a la cadena peptídica, se encuentran en una posición óptima para modular señales y actuar como determinantes de reconocimiento.

Tanto el tipo como el grado de glicosilación de las glicoproteínas producidas por células de mamífero recombinantes dependen de varios factores:

- La especie animal de la cual proviene la línea celular utilizada para expresar la glicoproteína (Savage, 1997; James y col., 1995; Goochee y Monica, 1990).
- La línea celular productora, ya que la misma proteína puede presentar diferentes estructuras en sus sitios de glicosilación dependiendo de la célula que fue transfectada

(Nimtzy y col., 1993; Goochee, 1992; Goto y col., 1988; Sheeley y col., 1997; Gawlitzek y col., 1995; Schenkle y col., 1997).

- El sistema de cultivo (Watson y col., 1994; Gawlitzek y col., 1995, 1998; Jenkins y Curling, 1994; Schweikart y col., 1999).
- La densidad celular del cultivo (Etcheverry y Ryll, 1998).
- Las modificaciones en el entorno celular ocasionadas por la depleción de nutrientes y/o la acumulación de subproductos durante el tiempo de cultivo (Jenkins y Curling, 1994).
- El contenido de amonio intracelular, ya que puede reducir la sialidación de oligosacáridos tanto O- como N-linked por alteración directa del entorno *trans*-Golgi (Yang y Buttler, 2000a; Borys y col., 1994).
- El nivel de oxigenación del cultivo, ya que tanto la hipoxia como la hiperoxia pueden alterar el perfil de glicosilación de la glicoproteína (Chotigeat y col., 1994; Kunkel y col., 1998; Restelli y col., 2006).
- La adición de suplementos al medio de cultivo, como el butirato de sodio (Chotigeat y col., 1994; Hendrick y col., 2001), Pluronic F-68, EDTA, buffer HEPES, lipoproteínas (Jenkins y col., 1994), hormonas, vitaminas y antibióticos, entre otros (Goochee y Monica, 1990).
- La presencia, nivel de expresión y cambios en la actividad de las glicosiltransferasas concomitantes con el estadio del crecimiento celular pueden afectar el camino de biosíntesis y conducir, por ejemplo, a cambios en el grado de ramificación durante las fases de cultivo (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Goto y col., 1988).
- La presencia de glicosidasas – fundamentalmente sialidasas – en el sobrenadante de cultivo (Munzert y col., 1996; Gu y Wang, 1998; Yoon y col., 2005).
- El aumento del *pool* de azúcar-nucleótidos (UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc) (Goochee y Monica, 1990; Pels Rijcken y col., 1995).
- Las variaciones de pH, ya sea del pH extracelular (Borys y col., 1994; Yoon y col., 2005) o intracelular (Maiorella, 1992; Thorens y Vasalli, 1986; Borys y col., 1993).
- La temperatura del cultivo (Hearing y col., 1989; Yoon y col., 2005).
- La velocidad de crecimiento celular (Hayter y col., 1993) y la velocidad de expresión de la glicoproteína (Chotigeat y col., 1994; Etcheverry y Ryll, 1998).
- La presión parcial de dióxido de carbono disuelto (cuyos valores están comprendidos entre 10 mm Hg y 160 mm Hg), cuyo incremento causa el aumento en aproximadamente

tres veces de la relación ácido N-glicolilneuramínico a ácido N-acetilneuramínico (Jenkins y Curling, 1994).

- La osmolalidad del medio de cultivo (Ozturk y Palsson, 1991; Zanghi y col., 1999).
- La privación de glucosa, que conduce a una depleción del estado de energía celular, afecta el paso inicial de la biosíntesis de oligosacáridos *N-linked* originando un menor grado de glicosilación de las proteínas recombinantes (Hayter y col., 1993; Tachibana y Murakami, 1994; Goochee, 1992; Goochee y Monica, 1990).
- La concentración de glutamina en el medio de cultivo (Glacken y col., 1986).
- La utilización de medios de cultivo adicionados de suero, libres de suero y libres de proteínas (Gawlitsek y col., 1995; Koll y col., 2000).

Como se verificará en este trabajo de tesis, el proceso de glicosilación es extremadamente sensible a cambios en la composición del medio de cultivo, aún frente a ligeras alteraciones que no afectan el crecimiento y la productividad celulares.

1.8. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las LCCm son considerablemente más complejos (en cantidad y calidad de nutrientes) y más caros que los empleados en el cultivo de microorganismos. Varios componentes de estos medios son termosensibles (aminoácidos, vitaminas), lo que afecta directamente los procesos de esterilización y almacenamiento de estas soluciones.

Ninguno de los medios disponibles comercialmente son producto de un desarrollo sistemático similar al utilizado para los medios de cultivo de microorganismos: la utilización de compuestos cuyo rol en el metabolismo celular no ha sido completamente elucidado – y que por prueba y error se verifican necesarios – puede conducir así a limitaciones y/o inhibiciones desconocidas, las que a su vez podrían causar presiones selectivas, resultando así en la selección de aquellas células dentro de la población que mejor se adapten a estas condiciones (Leist y col., 1990). A pesar de ello, el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de proteínas recombinantes en cultivos de células de mamífero ha sido extensamente estudiado (Park y col., 1992; Cox y McClure, 1983; Mizutani y col., 1992; Le Gros y col., 1985; Huang y col., 1991; Reuveny y col., 1986; Dircks y col., 1987; Sugiura, 1992).

Tradicionalmente se ha utilizado suero de origen animal (suero fetal bovino, suero

bovino adulto, suero equino) como suplemente del medio de cultivo empleado para el crecimiento de las células de mamífero cultivadas *in vitro*. El suero agregado cumple múltiples funciones, tales como el aporte de factores de crecimiento, proteínas *carriers*, hormonas, lípidos e inhibidores de proteasas, la unión y neutralización de toxinas, la protección frente a las fuerzas de corte, el aumento de la capacidad *buffer* frente a variaciones leves del medio de cultivo, entre otras (Leist y col, 1990). Este suplemento puede tener un efecto decisivo sobre el crecimiento y la productividad celulares, así como afectar un gran número de funciones metabólicas, como por ejemplo la glicosilación de proteínas. Se ha observado así que la concentración óptima de suero en el medio de cultivo para la producción de proteínas recombinantes puede ser diferente de la concentración óptima para el crecimiento de las células (Ramírez y Mutharasan, 1990).

Entre las dificultades asociadas al uso de suero animal en los cultivos de células utilizadas en la producción de proteínas de uso terapéutico se encuentran:

- Su composición indefinida.
- Su alto costo.
- Su alto contenido de proteínas, que dificulta y encarece el proceso de purificación del producto de interés, e introduce complicaciones técnicas asociadas a la formación de espuma (interferencia con filtros, válvulas, bombas, necesidad del uso de antiespumantes).
- La variabilidad lote a lote.
- El potencial riesgo de la presencia de micoplasmas, virus y otros agente adventicios.

Desde hace varios años la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU, 1997) alerta sobre la necesidad de la sustitución de suero en los medios de cultivo utilizados en la producción de biofármacos. Se han utilizado así numerosos suplementos (tanto en forma individual como conjunta) con el objetivo de sustituir el suero animal: albúmina (Castro y col., 1995), insulina (Gebert y Gray, 1995), vitaminas (Altamirano y col., 2006b; Castro y col., 1992), transferrina (Barnes y Sato, 1980; Glassy y col., 1988), etanolamina (Kovar y Franek, 1986), lípidos (Altamirano y col., 2006b; Butler y Huzel, 1997; Castro y col., 1995; Jenkins y col., 1994), colesterol (Castro y col., 1992; Tomeczkowski y col., 1993), y selenio (Glassy y col., 1988; Sandstrom y col., 1993), entre otros.

El desarrollo de medios de cultivo de composición definida, es decir libres de suero, hidrolizados proteicos u otras mezclas de origen animal o vegetal cuya composición exacta no pueda ser determinada ni reproducida, y de medios libres de cualquier proteína, ha sido objeto de numerosos estudios (Keen y Rapson, 1995; Kim y col., 1999; Kovar y

Franek, 1986; Zang y col., 1995; Yoon y col., 2005). Entre las ventajas que ofrecen estos medios de cultivo se encuentran las siguientes:

- Reproducibilidad de los cultivos.
- Menor riesgo de aparición de patógenos oportunistas (virus, micoplasmas, priones).
- Simplificación y reducción de costos del proceso de purificación.

No obstante, debe tenerse en cuenta que la formulación óptima de un medio de cultivo libre de suero o de un medio de cultivo libre de proteínas depende fuertemente de la línea celular empleada, del clon particular, de las condiciones de cultivo y de las variables del proceso, por lo que debe ser objeto de un estudio cuidadoso y específico para cada caso (Tokashiki y Yokoyama, 1997; Ryu y Lee, 1997; Altamirano y col., 2006b).

El cultivo de células en medios libres de suero o libres de proteínas puede presentar algunas diferencias con respecto al medio de cultivo tradicional de una misma línea celular. Neermann y Wagner (1996) determinaron que las células de mamífero cultivadas en medios libres de suero y de bajo contenido proteico presentaron velocidades más altas de consumo de glucosa y glutamina, observándose también actividades enzimáticas más elevadas, que cuando estas mismas células eran cultivadas en medios suplementados con suero. La utilización de medios de cultivo libres de suero puede conducir, además, a variaciones en el patrón de glicosilación: Gawlitzek y col. (1995) reportaron un incremento en la *O*-glicosilación, la sialidación terminal y la fucosilación proximal α 1-6 de una variante de IL-2 producida en células BHK-21, cuando éstas eran cultivadas en un medio libre de suero, tanto en suspensión como adheridas a *microcarriers*. Esta variabilidad debe ser cuidadosamente considerada durante el desarrollo de un medio de cultivo destinado a la producción de una proteína cuya actividad biológica depende tanto de su glicosilación, como es el caso de la rhEPO.

1.9. SISTEMAS DE CULTIVO CELULAR

En el cultivo de células animales se emplean diferentes sistemas para el crecimiento celular, en función de la capacidad de las células de crecer en forma dependiente o independiente de una superficie (denominada *sustrato*), es decir, adheridas o en suspensión.

1.9.1. **Sistemas adherentes**

Para el crecimiento de las células adherentes se emplean numerosos soportes, entre los que se encuentran:

- **Placas de cultivo:** placas de poliestireno con un número variable de pozos, de diferente superficie, para el cultivo celular en microescala (volumen máximo de cultivo = 5 ml).
- **Frascos T:** frascos de poliestireno que proveen una muy alta relación superficie:volumen. Los más utilizados poseen una superficie útil de crecimiento de 25 cm², 75 cm² y 150 cm² (volumen máximo de cultivo = 60 ml).
- **Frascos roller:** frascos cilíndricos sobre cuya superficie interna crecen las células. Requieren de una cámara de cultivo especial en la cual son posicionados horizontalmente, permitiendo su rotación a velocidades variables con el fin de bañar completamente las células con medio de cultivo (volumen máximo de cultivo = 250 ml).
- **Microcarriers:** son soportes poliméricos relativamente cilíndricos, lisos o porosos, que permiten el desarrollo de células adheridas a su superficie. Se utilizan principalmente en biorreactores agitados, que los mantienen en suspensión (volumen máximo de cultivo = 10.000 l).

1.9.2. **Sistemas en suspensión**

Los sistemas de cultivo en suspensión requieren que las células sean previamente adaptadas al crecimiento en estas condiciones; es decir, éstas deben perder su adhesión al sustrato y replicarse en un cultivo en agitación continua.

- **Frascos agitados tipo spinner:** Estos frascos de vidrio borosilicato son agitados magnéticamente, ya sea mediante un péndulo o una pequeña hélice con una pequeña pieza metálica en su interior, sujetos a la tapa. Estos frascos se posicionan en una placa agitadora que posee un imán que gira a una velocidad definida, variable, y que permite así una agitación suave y homogénea del cultivo, tanto vertical como horizontalmente, minimizando las fuerzas de corte.
- **Biorreactores:** En general, los biorreactores se clasifican en dos grandes categorías (Tokashiki y Yokoyama, 1997): los biorreactores para células en suspensión (tipo tanque agitado y tipo *airlift*) y los biorreactores para células inmovilizadas (*microcarriers*, de fibra hueca, de membrana, de entrapamiento en perlas de agarosa o alginato, de espuma de poliuretano, de matriz cerámica, etc.).

La viabilidad de un proceso de producción a escala industrial mediante el cultivo de

células animales en biorreactores exige que se cumplan una serie de requisitos operacionales. Estos procesos deben, idealmente:

- Ser altamente eficientes desde el punto de vista económico.
- Presentar operabilidad, simplicidad y confiabilidad óptimas.
- Permitir fácilmente un aumento de escala de producción.
- Demandar un número reducido de unidades operacionales.
- Garantizar la obtención de un producto de alta calidad.

Una variable muy importante que debe ser considerada en el momento de definir un proceso productivo es el modo de operación del biorreactor; es decir, la producción en cultivos por lote (cultivos *batch*), por lote alimentado (*fed-batch*), cultivos continuos tradicionales (tipo quimiostato), o cultivos continuos con retención de células (con perfusión de medio de cultivo fresco). La elección depende de distintas variables, especialmente económicas (Marquis y col., 1990). Las principales características de cada sistema se describen a continuación (Tokashiki y Yokoyama, 1997).

1.10. MODOS DE CULTIVO

1.10.1. Modo de cultivo por lote (batch)

En estos sistemas se agrega todo el medio de cultivo en el biorreactor al comienzo del proceso, para luego inocular las células y dejar transcurrir el crecimiento sin que se adicionen medio fresco o suplementos al cultivo, y sin que se retire suspensión celular en momento alguno. Únicamente se permite el intercambio gaseoso con el exterior. El volumen del cultivo se mantiene constante a lo largo de todo el proceso. Es posible ajustar el nivel de DO y garantizar el crecimiento celular, pero no puede evitarse en estos sistemas el consumo de nutrientes o la acumulación de catabolitos potencialmente tóxicos, por lo que en relativamente poco tiempo (generalmente no más de 10 días) las células comienzan a morir.

Estos sistemas de cultivo son más simples (en términos de sus componentes y de su operación) que los restantes, pero presentan las desventajas de alcanzar concentraciones celulares relativamente bajas ($1-2 \times 10^6 \text{ cél.}^{-1} \text{ ml}^{-1}$), posibilidad de degradación del producto por acción de las enzimas liberadas al medio durante la lisis celular, y grandes tiempos improductivos, debido a la lentitud del crecimiento celular y la corta duración del proceso de producción.

1.10.2. Modo de cultivo por lote alimentado (fed-batch)

Estos sistemas son similares a los anteriores, ya que se coloca el medio de cultivo en el biorreactor y se inoculan las células, sin que se retire suspensión celular durante el proceso. La diferencia consiste en que durante el cultivo se va agregando medio de cultivo fresco o nutrientes específicos, en forma continua o intermitente, por lo que el volumen del cultivo no es constante a lo largo del proceso. Los nutrientes y el DO pueden ser ajustados de manera de optimizar el crecimiento, pero este sistema no impide la acumulación de catabolitos, por lo que también se observa una inhibición del crecimiento y el ingreso a una fase de muerte celular, en algún punto del proceso. Comparado con el sistema por lote, el modo por lote alimentado permite extender la vida del cultivo y obtener concentraciones celulares más altas al impedir la depleción de nutrientes. Sin embargo, la concentración y la calidad del producto resultan variables, ya que el incremento de su acumulación debido a la mayor densidad celular resulta contrarrestado por el efecto de la dilución realizada al agregar medio de cultivo fresco, y la acumulación de catabolitos puede todavía afectar el metabolismo de la célula productora.

1.10.3. Modo de cultivo continuo en quimiostato

En un sistema de cultivo continuo en quimiostato se agrega medio de cultivo fresco en forma continua al biorreactor, a la vez que se retira el mismo volumen, con el mismo flujo, de suspensión celular, permitiendo mantener así el volumen del cultivo constante. La velocidad de alimentación del medio fresco está determinada por la velocidad de crecimiento de las células, por lo que la cantidad de células “producidas” por unidad de tiempo es igual a la cantidad de células que sale del reactor, por unidad de tiempo, lo que hace que el sistema se mantenga en un estado estacionario. En estos procesos se aportan nutrientes y se ajusta el DO, a la vez que se retiran los productos de desecho, razón por la que no se observa una inhibición del crecimiento y los cultivos pueden extenderse considerablemente en el tiempo. Sin embargo, la pérdida de células en activa proliferación dificulta la obtención de altas densidades celulares y acumulación del producto de interés.

1.10.4. Modo de cultivo continuo con perfusión

En estos procesos se agrega medio de cultivo fresco en forma continua, en tanto se retira la misma cantidad de sobrenadante de cultivo libre de células del interior del reactor. De esta manera todas las células permanecen en el interior del biorreactor, siendo alimentadas con nutrientes y removiéndose los productos del catabolismo en forma continua. Estos sistemas permiten obtener densidades celulares muy altas

($0,1-1 \times 10^8 \text{ cél}^{-1}\text{ml}^{-1}$) así como una productividad incrementada del producto de interés, durante un período de tiempo prolongado (de varios meses, inclusive), si pueden mantenerse condiciones ambientales apropiadas, ya que las células continúan creciendo mientras se encuentren en el reactor. Los puntos críticos de este sistema radican en la necesidad de mantener un control óptimo de las condiciones de cultivo y de disponer de un sistema adecuado de retención de células (generalmente de alto costo), lo que los convierte en sistemas más complejos que los anteriores.

1.11. ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE

La eritropoyetina (EPO) es una proteína altamente glicosilada con una masa molecular aproximada de 32-34 kDa (Miyake y col., 1977; Davis y col., 1987; Melli y col., 2006), constituida por una única cadena invariable de 165 aminoácidos que posee cuatro residuos cisteína entre los que se establecen dos puentes disulfuro (Cys7/Cys161 y Cys29/Cys33) (Lai y col., 1986; Recny y col., 1987). El 40% de su masa corresponde a carbohidratos (Jelkmann, 2003) y esta porción glicosídica, rica en ácido siálico, es crítica para la estabilidad molecular y la actividad biológica *in vivo* de esta hormona.

Mediante espectroscopía por resonancia magnética nuclear (Cheetham y col., 1998) y la cristalografía de rayos X (Syed y col., 1998) se determinó que la EPO humana es una molécula alargada con cuatro cadenas α -hélice con giro a la izquierda (denominadas A, B, C y D), típica de los miembros de la familia de factores de crecimiento hematopoyéticos. Los sitios de adición de carbohidratos están ubicados en uno de los extremos de la molécula, distantes del sitio de unión al receptor. La estructura de la EPO se representa en la Fig. 4.

La estructura de carbohidratos de la EPO ha sido determinada, definiéndose la extensión de la microheterogeneidad tanto para la rhEPO como para la hormona natural (Sasaki y col., 1987, 1988; Takeuchi y col., 1988; Tsuda y col., 1988). Las discrepancias encontradas entre los resultados de distintos autores al respecto de la glicosilación de la proteína recombinante, aún siendo producida por la misma línea celular (Tsuda y col., 1988; Gawlitzek y col., 1998) se deberían a los diferentes clones productores utilizados y/o a las condiciones de cultivo empleadas.

La porción carbohidrato de la EPO natural tanto como de la recombinante consiste en tres cadenas de azúcares *N-linked* en las posiciones Asn24, Asn38 y Asn83, en tanto la única cadena de carbohidratos *O-linked*, del tipo mucina, está en la Ser126 (Egrie y col. 1986).

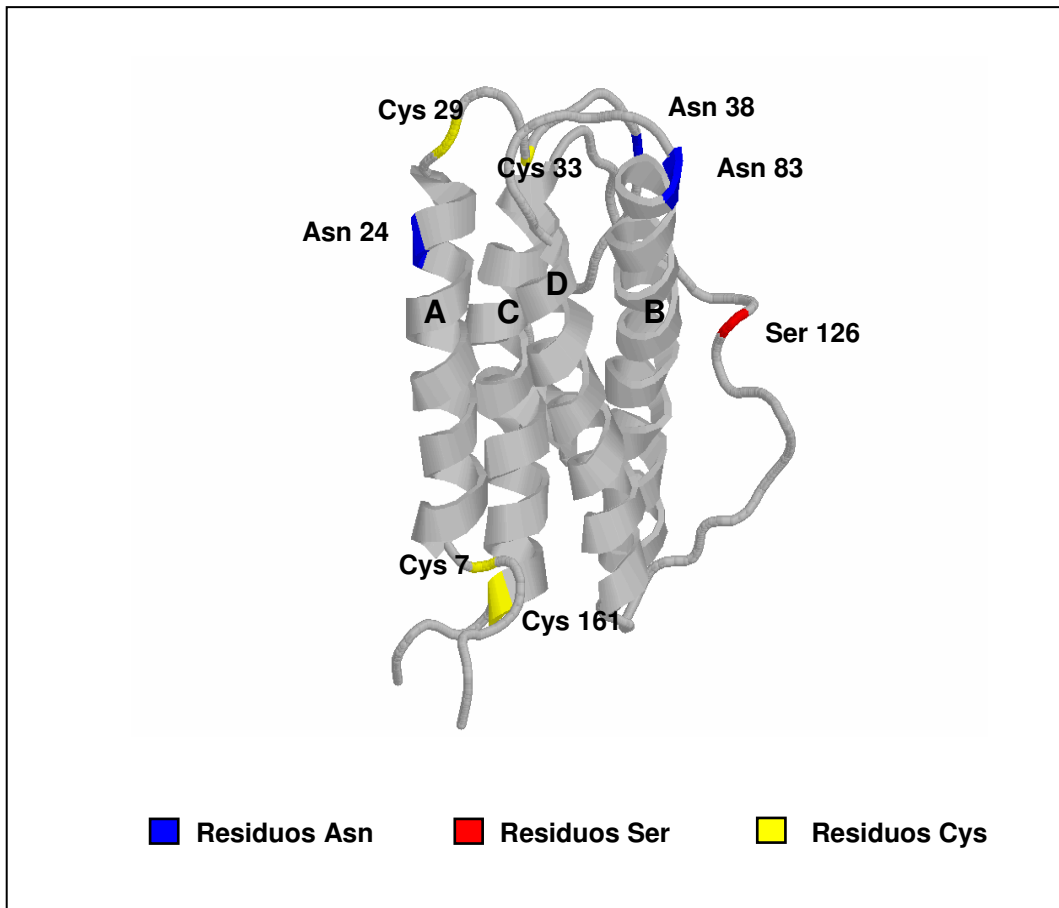


Fig. 4: Estructura de la molécula de eritropoyetina humana.

Uno de los ejemplos más prominentes de microheterogeneidad para EPO se observa en las cadenas *N-linked*, donde los oligosacáridos pueden organizarse en dos, tres o cuatro ramas, también llamadas *antenas*. A mayor antenaridad de la molécula de EPO, mayor será su actividad biológica (Yang y Butler, 2000c).

Cada una de las antenas de oligosacáridos contiene típicamente una molécula de NeuNAc (también llamada *ácido siálico*, con carga negativa) en su extremo terminal. Con excepción de esta molécula, todas las otras moléculas de azúcar en la EPO son neutras. De igual manera, el carbohidrato *O-linked* puede contener ninguna, una o dos moléculas de ácido siálico. Ya que cada uno de los tres oligosacáridos *N-linked* puede contener hasta un máximo de cuatro moléculas de ácido siálico, y la cadena única *O-linked* puede contener un máximo de dos, la molécula de EPO puede tener un máximo de catorce moléculas de ácido siálico. En consecuencia, debido a la variación en la estructura de azúcares, la cantidad de moléculas de ácido siálico por molécula de EPO no es constante. El subconjunto de moléculas de EPO que tienen una carga definida debido a su contenido de ácido siálico se

define como una *isoforma*. Estas isoformas pueden ser separadas en base a sus diferentes puntos isoeléctricos y/o estructura, utilizándose más comúnmente la electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente de pH o *isoelectroenfocado* (IEF, *isoelectricfocusing*) (Amadeo y col., 2004; Koll y col., 2000; Yoon y col., 2005) y la electroforesis capilar en zona (CZE, *capillar zone electrophoresis*) (Etcheverrigaray y col., 2003). El rango de pI para estas isoformas varía entre 3,0 y 5,1 (Restelli y col., 2006). De las 14 isoformas posibles de EPO, solamente se han aislado 11 a partir del sobrenadante de cultivo de células CHO (Egrie y col., 1993).

Las porciones de carbohidrato de glicoproteínas diferentes han demostrado cumplir diversas funciones, desde efectos sobre la biosíntesis y secreción, inmunoprotección, conformación, estabilidad, solubilidad y actividad biológica de las moléculas (Skehel y col., 1984; Cumming, 1991). Para la rhEPO en particular, la adición de carbohidratos es necesaria para que la célula pueda secretarla al medio, así como para incrementar la solubilidad de la molécula (Dube y col., 1988; Narhi y col., 1991; Delorme y col., 1992), habiéndose encontrado una correlación positiva entre su actividad biológica *in vivo* y una alta proporción de oligosacáridos ramificados. La remoción de las moléculas de ácido siálico tanto de la EPO nativa como de la recombinante resulta en moléculas que tienen incrementada su actividad biológica *in vitro*, pero muy poca actividad *in vivo*, presuntamente debido a una vida en circulación más corta por la remoción que realiza el receptor de asialoglicoproteínas que se encuentra en el hígado (Fukuda y col., 1989; Spivak y Hogans, 1989; Yoon y col., 2005). Estas moléculas, ya sean desializadas o deglicosiladas completamente, muestran una tendencia mayor a agregarse y a unirse inespecíficamente a la superficie de las células, así como una sensibilidad mayor a la degradación proteolítica y la desnaturalización térmica (Savage, 1997).

Egrie y Browne (2001) determinaron que el patrón de glicosilación de EPO tiene efectos significativos sobre la actividad biológica de la hormona, modulando tanto la afinidad al receptor como el *clearance* plasmático. Sus experiencias comprobaron la existencia de una relación directa entre el contenido de ácido siálico, la actividad biológica y la vida media en suero, pero inversa con la afinidad al receptor. Este hecho demuestra que el *clearance* tiene una influencia mucho mayor en la actividad biológica *in vivo* que la afinidad al receptor, ya que una vida media en suero más larga compensa y supera el efecto de una menor unión al receptor, para las moléculas más sializadas. Otros autores han establecido que a igual número de moléculas de ácido siálico terminal e igual antenaridad, la actividad biológica de la rhEPO depende marcadamente del contenido de unidades N-acetil-lactosamina que componen sus cadenas de oligosacáridos (Koll y col., 2000). En particular, estos autores indicaron que una preparación de isoformas de esta hormona que presente una alta relación

entre las estructuras hidrocarbonadas tetra-antenarias/bi-antenarias y un elevado número de unidades N-acetil-lactosamina en las cadenas de oligosacáridos *N-linked* resultará en una actividad biológica *in vivo* significativamente superior (Koll y col., 2000; Yang y Butler, 2000c).

Desde el punto de vista de su funcionalidad, la eritropoyetina es una hormona glicoproteica que actúa como regulador primario de la eritropoyesis, manteniendo el nivel de glóbulos rojos en el cuerpo en valores normales (Krantz, 1991; Lacombe y Mayeux, 1998). En respuesta a una disminución en la oxigenación de los tejidos (hipoxia), se incrementa la expresión del gen que codifica para la EPO en el riñón y el hígado (Jelkmann y Hellwig, 2001). El mecanismo primario de acción de la EPO para la regulación de la eritropoyesis es la supresión de la apoptosis de los precursores eritroides tardíos: la hormona secretada se une a receptores específicos en la superficie de los precursores de células rojas en la médula ósea, conduciendo a su supervivencia, proliferación y diferenciación, y consecuentemente a un aumento de los reticulocitos (D'Andrea y col., 1989; Jelkmann, 2003).

Esta hormona fue purificada por primera vez en 1977, a partir de la orina de pacientes anémicos de la Provincia de Corrientes en Argentina (Miyake y col., 1977), constituyendo el primer patrón de referencia. Ocho años después, y casi simultáneamente, el gen de la EPO fue clonado y transfectado en células CHO (Lin y col., 1985) y en células VERO (Jacobs y col., 1985). Desde su primera aplicación hace poco más de dos décadas, la rhEPO se ha utilizado como un tratamiento altamente efectivo de la anemia asociada con la enfermedad renal crónica, incrementando la calidad de vida de los pacientes. Ha sido aprobada además para el tratamiento de anemia asociada a cáncer, infección por HIV y se emplea también en cirugía para disminuir la necesidad de transfusiones sanguíneas alogeneicas, comprobándose que es altamente tolerable y eficaz en todos esos casos (Cazzola y col., 1997; Sowade y col., 1998).

Más recientemente, sin embargo, se determinó que la EPO es un miembro de la superfamilia de citoquinas tipo I (Wojchowski y col., 1999) y que tiene múltiples efectos sobre órganos y tejidos no relacionados con la hematopoyesis, como por ejemplo el cerebro, el tracto reproductivo (Marti y col., 1996; Kobayashi y col., 2002; Masuda y col. 2000), los pulmones, el bazo y el corazón (Fandrey, 2004). Particularmente, se ha verificado que la activación del factor central de transcripción como respuesta inmediata del organismo frente a la hipoxia rápidamente induce una serie de procesos – entre ellas, la producción de EPO -, con el fin de contrarrestar la hipoxia y evitar así el daño de los tejidos (Savino y Ciliberto, 2004). Las mínimas cantidades de EPO producidas no serían suficientes para disparar un aumento significativo de los eritrocitos, pero lo serían para actuar en forma parácrina y así

mantener la homeostasis tisular. Este mecanismo se autocontrolaría y dejaría de actuar en respuesta a un aumento en el flujo de sangre y, consecuentemente, en la presión de oxígeno.

Ghezzi y Brines (2004) señalaron que la EPO y su receptor (EPOR) tienen una función prominente durante el desarrollo cerebral fetal: experimentos de *knock-out* del gen que codifica para esta proteína confirmaron su importancia, observándose un desarrollo anormal del cerebro de embriones de animales EPOR^{-/-}, con un número inferior de las células progenitoras de neuronas y una menor masa de estas células nerviosas, asociadas ambas a un fenómeno de apoptosis neuronal masivo.

Recientemente se ha publicado un enorme número de trabajos que demuestran el efecto protector de la EPO en varios modelos *in vivo* (Nishihara y col., 2006; Erhe y col., 2007; Minh y col., 2007; Ehrenreich y col., 2007; Lipšic y col., 2006; Sirén y col., 2001). En la actualidad se llevan a cabo estudios para determinar si el efecto neuroprotector de esta hormona se limita a las lesiones pos-isquémicas agudas o si éste puede extenderse a las enfermedades neurodegenerativas crónicas como el mal de Alzheimer o el de Parkinson, lo que abre grandes posibilidades a ser exploradas para nuevas utilizaciones terapéuticas de la eritropoyetina.

2-OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

En este trabajo de tesis se propone la optimización de la producción de rhEPO mediante el cultivo de células animales, abarcando el estudio, selección y optimización de las condiciones de cultivo para la obtención de una molécula similar a la natural, con alto rendimiento celular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener nuevos clones productores de rhEPO, adaptarlos al crecimiento en suspensión en medios de cultivo reducidos en suero y medios de cultivo libres de proteínas y caracterizarlos en términos de su crecimiento, su productividad y el perfil glicosídico de la molécula producida.
2. Estudiar el efecto de la adición al medio de cultivo de diferentes compuestos (N-acetilglucosamina, N-acetilmanosamina y NH_4Cl) sobre el crecimiento, productividad y perfil de glicoformas rhEPO producidas por el clon productor seleccionado.
3. Estudiar el efecto del uso de medios de cultivo hiperosmolales e hipoosmolales sobre el crecimiento, productividad y perfil de glicoformas rhEPO producidas por el clon productor seleccionado.
4. Estudiar el efecto del uso de diferentes fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento, productividad y perfil de glicoformas rhEPO producidas por el clon productor seleccionado.
5. Definir uno o más medios de cultivo libres de proteínas que favorezcan el crecimiento y la productividad del clon productor en suspensión, y permitan obtener una molécula de rhEPO de alta calidad glicosídica, empleando para ello el diseño de experimentos y el análisis racional de los resultados obtenidos, mediante diferentes metodologías quimiométricas.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas durante el desarrollo del presente trabajo fueron:

3.1.1. Línea rhEPO-CHO.K1

Se trabajó con diez líneas recombinantes de células CHO.K1, productoras de eritropoyetina humana, provistas por el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina). Estas líneas fueron transfectadas con el plásmido para expresión en eucariotas pK4-Apa-Gepo, que contiene el promotor temprano del SV40, un origen de replicación para su amplificación en *Escherichia coli*, un gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias, y un gen de resistencia a neomicina para seleccionar líneas eucariotas transfectantes, así como sitios de restricción en los que fue insertado el gen de la eritropoyetina humana.

3.1.2. Clon Hy2B2

Este hibridoma produce un anticuerpo monoclonal murino de tipo IgG anti-eritropoyetina humana, el cual reconoce todas las isoformas de esta glicoproteína (Amadeo y col., 2004), y fue provisto por el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina).

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

3.2.1. Condiciones generales

Para la disolución de los componentes de los medios de cultivo que se describen a continuación se empleó agua ultrapura (resistividad de 18,2 MΩ cm), obtenida en un equipo Milli Q^{UF}₁₀ (Millipore, Francia), estéril y apirógena. La esterilización de los medios de cultivo se realizó por filtración a través de membranas con un diámetro de poro de 0,2 μm (Millipore, Francia). Con el fin de controlar el proceso de esterilización, se tomaron dos muestras del medio filtrado, incubando una de ellas a TA y la otra a 37°C, durante 7 días.

El SFB (Bioser, Argentina) empleado para suplementar los medios de cultivo fue

previamente calentado en baño de agua termostatzado a 56°C durante 30 min, con el fin de inactivar la cascada del complemento que podría inducir lisis celular.

Para los cultivos en suspensión se adicionó al medio Pluronic F-68 (Sigma, EE.UU.), en una concentración de 0,05% (V/V). Este surfactante no iónico se emplea usualmente en los cultivos en biorreactores agitados, dado que tiene el efecto de incrementar la viscosidad del medio y reducir la adhesión de las células a las burbujas producidas por la agitación, actuando así como un agente citoprotector (Handa-Corrigan y col., 1987; Jobses y col., 1991). En este trabajo también se agregó a los cultivos en frascos *spinner* con el fin de tener en consideración un potencial efecto sobre el metabolismo de las células en suspensión (Papoutsakis, 1991), previendo el escalamiento de los cultivos.

Todos los medios de cultivo empleados en este trabajo contienen sulfato de gentamicina 0,05 g l⁻¹.

3.2.2. Medio de cultivo estándar con alto contenido de glucosa y glutamina (MCE-AGG)

El denominado **medio de cultivo estándar con alto contenido de glucosa y glutamina** empleado fue el descrito por Kratje y Wagner (1992), con la siguiente formulación:

Tabla IV: Composición del medio de cultivo MCE-AGG.

Componente	Concentración
DMEM:Ham's F12	1:1
NaHCO ₃	2,44 g l ⁻¹
D(+)-glucosa	1,30 g l ⁻¹
Piruvato de sodio	0,11 g l ⁻¹
Glutamina	1,50 g l ⁻¹
Triptofano	0,027 g l ⁻¹
Ácido aspártico	0,04 g l ⁻¹
Serina	0,08 g l ⁻¹
Concentración final de glucosa:	28,3 mM
Concentración final de glutamina:	12,8 mM

3.2.3. Medio de cultivo estándar (MCE)

La composición del **medio de cultivo estándar** empleado se detalla a continuación:

Tabla V: Composición del medio de cultivo MCE.

Componente	Concentración
DMEM:Ham's F12	1:1
NaHCO ₃	2,44 g l ⁻¹
Piruvato de sodio	0,11 g l ⁻¹
Triptofano	0,027 g l ⁻¹
Ácido aspártico	0,04 g l ⁻¹
Serina	0,08 g l ⁻¹
Concentración final de glucosa: 20 mM	
Concentración final de glutamina: 2,5 mM	

3.2.4. Medio SMIF 6

El medio **SMIF 6** (Life Technologies, Reino Unido) (Wolf y col., 1993) es un medio de cultivo libre de proteínas que permite alcanzar elevadas concentraciones de células CHO y BHK similares a las obtenidas con medios tradicionales adicionados de SFB, sin pérdida de productividad (Scharfenberg y Wagner, 1995). Este medio, sin HEPES ni EDTA, fue gentilmente provisto por el grupo de trabajo en cultivos celulares del Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig, Alemania). La concentración final de glucosa es 25 mM y de glutamina, 4 mM.

3.2.5. Medio Zell-C

El denominado **Medio Zell-C** es un medio base libre de proteínas, diseñado durante el desarrollo del presente trabajo de tesis, el cual es manufacturado como *custom-made* por la empresa Applichem (Alemania). Este medio consiste en una mezcla de aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, sales inorgánicas y moléculas de origen orgánico, y requiere de la adición de diferentes compuestos que actúan como proveedores de energía química. La concentración de glucosa es ≤ 25 mM y de glutamina, ≤ 4 mM (de acuerdo con los resultados mostrados).

3.2.6. Medio de cultivo para hibridomas

El cultivo del clon productor del anticuerpo monoclonal 2B2 anti-rhEPO se realizó en el siguiente medio:

Tabla VI: Composición del medio de cultivo para hibridomas.

Componente	Concentración
DMEM	13,37 g l ⁻¹
NaHCO ₃	3,7 g l ⁻¹
Piruvato de sodio	0,11 g l ⁻¹
Tylosina (a-PPLO)	0,06 g l ⁻¹
SFB	10% (V/V)

3.3. CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS

La conservación de células por congelación o *criopreservación* es un método que permite mantener intactas las propiedades metabólicas de las células al momento de ser congeladas (Hasegawa, 1996), si se tienen en cuenta los siguientes requerimientos:

- Las suspensiones celulares deben encontrarse en fase exponencial de crecimiento con una viabilidad superior al 90%.
- La congelación debe ser realizado gradualmente, disminuyendo la temperatura en forma lenta (-1°C a -3°C por min) y la descongelación debe ser rápida (50°C a 100°C por min) (Harris y Griffiths, 1977).
- Se aconseja el uso de crioprotectores como el dimetilsulfóxido de sodio (DMSO), el glicerol y la metilcelulosa, los cuales atraviesan la membrana celular y protegen a las células de su lisis debido a la formación de cristales de hielo en su interior. Debido a la alta concentración utilizada, necesaria para disminuir la formación de cristales de hielo, son citotóxicos a la temperatura normotérmica y causan estrés osmótico, por lo que deben ser eliminados luego de la descongelación (McGann, 1978).

Las líneas celulares pueden ser preservadas por períodos indefinidos siempre que se mantengan a una temperatura inferior a -135°C. Estas condiciones se logran conservando los crioviales a -196°C en nitrógeno líquido o en atmósfera de vapor de este gas (fluctuante entre -135°C y -190°C).

3.3.1. Congelación

Para la congelación de células se siguió una adaptación de la técnica de Gustafsson (1990). Se realizó el recuento de células de una suspensión que se encontraba en fase de crecimiento exponencial, determinándose el volumen de suspensión necesario para congelar 1×10^7 cél. viables por criovial (Nalgene, EE.UU.). Este volumen se centrifugó entonces 8 min a 200 g, a temperatura ambiente, y el *pellet* celular se resuspendió en la mezcla de criopreservación, constituida por SFB:DMSO en una relación 95:5, dispensándose 1 ml de esta suspensión por criovial. El proceso de congelación se llevó a cabo gradualmente:

- 1 hora a 4°C
- 1 hora a -20°C
- 1 hora a -70°C

Los crioviales se almacenaron finalmente en termos con nitrógeno líquido.

3.3.2. Descongelación

La descongelación de las células se realizó mediante una modificación del protocolo propuesto por Pollard (1990):

El criovial se retiró del termo con nitrógeno líquido y se sumergió inmediatamente en un baño de agua a 37°C, agitándolo hasta que se descongeló totalmente su contenido. La suspensión celular se diluyó inmediatamente en 40 ml de medio de cultivo precalentado a 37°C, y se procedió a centrifugarla 8 min a 200 g. El *pellet* celular se resuspendió cuidadosamente en un volumen adecuado de medio y se realizó el recuento de células con el fin de determinar su viabilidad, para luego transferir la suspensión a un recipiente de cultivo.

3.4. CULTIVO DE CÉLULAS

3.4.1. Clonado celular

El clonado de las líneas celulares se realizó según el *método de dilución límite* propuesto por Whitlock y Müller-Sieburg (1990), el cual consiste en realizar una dilución apropiada de una suspensión celular de manera que sea posible sembrar células aisladas en una placa de cultivo. Estas células darán origen a una colonia de células genéticamente

idénticas a la célula madre (*clones*).

En primer lugar se realizó el recuento de una suspensión celular en fase de crecimiento exponencial (viabilidad igual o superior al 95%). Una vez determinada la concentración de células viables se realizaron las diluciones apropiadas con el fin de obtener tres suspensiones celulares, de la siguiente concentración: 50 células en 100 ml; 500 células en 100 ml y 5.000 células en 100 ml, en medio MCE-AGG adicionado con SFB 20% (v/v) y Geneticín $400 \mu\text{g ml}^{-1}$. Este último se agregó al medio de cultivo para ejercer una presión selectiva sobre el crecimiento. Las diferentes diluciones se prepararon con el fin de evitar que el error asociado al recuento celular afectase el proceso de clonado. Cada una de estas diluciones se sembró en un tercio de una placa de 96 pozos ($200 \mu\text{l}$ por pozo). De esta forma se obtuvieron 32 pozos con un promedio de 0,1 células por pozo (es decir, 1 célula cada 10 pozos), 32 pozos con un promedio de 1 célula por pozo y los restantes 32 pozos con un promedio de 10 células en cada pozo. El clonado de la población de células se consideró exitoso cuando se observó el crecimiento de colonias provenientes de una única célula madre (es decir, una colonia formada por células del mismo clon) en al menos uno de los pozos en los que se sembró la dilución más alta. Aquellos pozos en los que se observó inicialmente más de una célula fueron descartados.

3.4.2. **Cultivos estáticos de células adherentes**

Para el cultivo de las células que crecen en adherencia se emplearon:

- **Frascos T** (*T-flasks*, Greiner Bio-One, Alemania) de 25 cm^2 , 75 cm^2 y 175 cm^2 de superficie, utilizándose una relación de 0,4 ml de medio de cultivo por cm^2 de superficie (Freshney, 1994).
- **Placas de poliestireno** de 96, 24 y 6 pozos (Greiner Bio-One, Alemania) con una superficie de 0,4; 2,0 y $9,6 \text{ cm}^2$, respectivamente.

Los subcultivos de células CHO que crecen en adherencia requieren del uso de proteasas con el fin de liberar las células del sustrato sobre el que se encuentran ancladas.

En este trabajo se siguió el protocolo que se indica a continuación:

1. Se retiró en forma total el medio de cultivo mediante pipeta.
2. Se agregó solución de tripsina – la cual debe encontrarse entre 20°C y 37°C – en una relación de $20 \mu\text{l}$ por cm^2 , distribuyéndose homogéneamente sobre la superficie a tratar y se retiró inmediatamente. La composición de la solución de tripsina así como la de

todas las soluciones mencionadas en Materiales y Métodos se detalla en la sección 3.11. Este paso se realizó para neutralizar la actividad antiproteásica que pudiera haber quedado en el medio de cultivo remanente sobre la monocapa celular.

3. Se agregó nuevamente solución de tripsina, en la relación mencionada, dejándola actuar sobre las células. El proceso de desorción de las células fue controlado por observación al microscopio, y cuando las células estuvieron despegadas – verificado por su forma redondeada – se homogenizó la suspensión cuidadosamente con pipeta por unos segundos.
4. Se agregó luego medio de cultivo fresco y se homogenizó la suspensión. Se tomó una alícuota para su recuento y con este resultado se realizó la dilución correspondiente con medio de cultivo fresco.

3.4.3. Cultivo de células en suspensión

3.4.3.1. Cultivo de células en frascos agitados tipo *spinner*

Para el cultivo de las células adaptadas al crecimiento en suspensión se emplearon frascos agitados tipo *spinner* de 125 ml, 250 ml y 500 ml (Techne, Reino Unido), y de 100 ml y 250 ml (Bellco Glass Inc., EE.UU.). La configuración de estos frascos permite un recirculación de la suspensión suave y homogénea en los ejes vertical y horizontal, a la vez que favorece el intercambio de gases con la cámara superior. En todas las experiencias realizadas se trabajó a una velocidad de agitación de 45-50 rpm.

Los subcultivos de células que crecen en suspensión se realizan por simple dilución (no inferior a 1:3) del inóculo con medio fresco, luego de realizar el recuento celular, con el fin de obtener un cultivo con una densidad inicial de $1,5 - 2,5 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1} . Cuando la concentración celular no resulta suficiente para realizar un subcultivo en estas condiciones, se procede a centrifugar parte de la suspensión (8 min a 200 g), resuspendiendo las células en un volumen apropiado de medio fresco.

3.4.3.2. Cultivo de células en un biorreactor de agitación

El cultivo de células se realizó en un biorreactor de 5 l, tipo tanque agitado con sistema de perfusión de medio de cultivo (Modelo ALF, Bioengineering AG, Suiza). Este biorreactor se muestra en la Fig. 5.



Fig. 5: Vista general del biorreactor con los módulos periféricos, tales como el motor de agitación (gabinete ubicado debajo del vaso de vidrio), la estación de mezclas de gases (gabinete lateral superior) y las unidades de control (gabinete lateral inferior) y con los equipos periféricos, como la cabina de seguridad biológica con flujo laminar de aire estéril, para la manipulación en condiciones de esterilidad.

El recipiente de cultivo es de vidrio borosilicato, apto para su esterilización en autoclave. La pared cilíndrica lateral del recipiente está provista de un doble manto destinado al control de temperatura mediante un baño de agua externa (termostato). El diámetro interno del vaso es de 150 mm, el diámetro externo es de 200 mm y la altura, de 400 mm. El volumen total del recipiente es de 7 litros, siendo el volumen máximo de trabajo de 5 litros.

La tapa del reactor es de acero inoxidable 316L, y se sujeta al recipiente mediante pernos y tuercas que están montados sobre dos dispositivos circulares (en la porción superior e inferior del vaso). El *O-ring* alojado entre la tapa de acero inoxidable y el borde superior del recipiente de vidrio permite mantener un ambiente interno estéril. La tapa contiene diversas conexiones a rosca de diferentes diámetros, las que están provistas de los correspondientes *O-rings* para mantener la hermeticidad del reactor.

El biorreactor utilizado es un sistema complejo formado por diferentes dispositivos interconectados, y que requiere de equipamientos accesorios. El conjunto completo empleado en los experimentos de este trabajo incluye:

- El recipiente del reactor propiamente dicho.
- El dispositivo de agitación.

- El dispositivo de perfusión.
- El dispositivo de ingreso de gases.
- El dispositivo de salida de gases.
- Las sondas de pO₂, pH, nivel de medio y temperatura.
- Los dispositivos de toma de muestra, de agregado de inóculo con la botella de siembra, de alimentación de medio de cultivo y de cosecha de medio de cultivo libre de células.
- La estación de mezcla de gases.
- La unidad de comando y regulación.
- El sistema de regulación de la temperatura (termostato), destinado al mantenimiento de la temperatura del proceso de cultivo.
- El generador de vapor, destinado a la esterilización de los dispositivos de toma de muestra, de agregado de inóculo, de alimentación de medio de cultivo y de cosecha de medio de cultivo libre de células.
- Una cabina de seguridad biológica con flujo laminar de aire estéril, para la manipulación en condiciones de esterilidad.
- Una heladera para mantener el recipiente de la cosecha a una temperatura de aproximadamente 4 °C.

3.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN CULTIVOS CELULARES

3.5.1. *Determinación de la concentración de células viables y totales*

Para la determinación de la viabilidad de un cultivo se emplean las llamadas *técnicas de exclusión del colorante*. Estas técnicas se basan en que ciertos colorantes no son capaces de penetrar las membranas celulares intactas, pero sí aquellas que han aumentado su permeabilidad, efecto que se asocia con la pérdida de viabilidad. Entre los colorantes de uso más frecuente se encuentran la safranina, la eosina, el rojo Congo, la eritrocina, la nigrosina, el azul de Alcian, el naranja de acridina y el azul de tripán (Kaltenbach y col., 1958; Yuhas y col., 1974; Jones y Senft, 1985; Griffiths, 1986; Cook y Mitchell, 1989). Este último es el que se ha utilizado en el presente trabajo, y tiñe las células no viables de azul, sin penetrar las viables.

Para hacer el recuento de las células se empleó un hemocitómetro de doble cámara, provisto del cuadrículado de Neubauer. Cada cámara permite realizar cuatro recuentos independientes, cada uno sobre un volumen de suspensión de $0,1 \text{ mm}^3$.

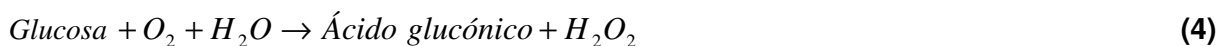
Se preparó entonces una dilución apropiada de la suspensión celular con el colorante, se cargó la cámara y se realizó el recuento del número de células viables (no teñidas de azul) y no viables (azules) en un microscopio óptico invertido Olympus IX50 (Olympus, Japón). Se calculó el promedio de cada tipo celular por hemicámara (\bar{X}) y se multiplicó por 10.000, obteniéndose así el número promedio de células por mililitro de suspensión *diluida* [Ec. (3)].

$$X_{(m)} = \frac{\bar{X}_{cél.}}{0,1 \text{ mm}^3} \times \frac{1 \text{ mm}^3}{0,001 \text{ cm}^3} \times \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ ml}} = \bar{X} \times 10^4 \frac{cél.}{ml} \quad (3)$$

El resultado obtenido se multiplicó luego por la inversa de la dilución realizada a la muestra del cultivo para obtener la concentración de células en la suspensión inicial. Se recomienda que la suspensión de la muestra sobre la que se realiza el recuento tenga entre 300.000 y 500.000 $cél. \text{ ml}^{-1}$, con el fin de minimizar el error de la técnica.

3.5.2. Determinación de la concentración de glucosa y lactato

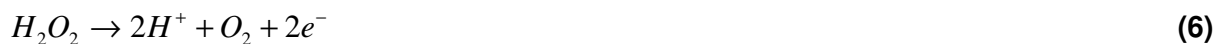
La determinación de glucosa y lactato se realizó mediante el autoanalizador YSI 2700 (Yellow Spring Instruments, EE.UU.) de lectura dual, equipado con biosensores específicos. Cada uno de éstos contiene una enzima inmovilizada sobre una membrana de policarbonato. Así, en el biosensor en el cual se encuentra la enzima *glucosa oxidasa* se lleva a cabo la siguiente reacción:



En el otro biosensor, la enzima *lactato oxidasa* cataliza la siguiente reacción:



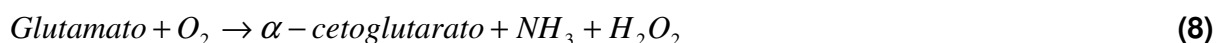
El peróxido de hidrógeno generado independientemente en cada biosensor es oxidado en un ánodo de platino, según la siguiente semirreacción:



El flujo de electrones (e^-) es linealmente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno formado y ésta, a su vez, a la concentración de la sustancia presente en la muestra. Se consideró aceptable una variación del 2% entre dos calibraciones sucesivas.

3.5.3. **Determinación de la concentración de glutamina y glutamato**

La determinación de glutamina y glutamato presentes en el sobrenadante de cultivo se llevó a cabo empleando el autoanalizador YSI 2700 anteriormente descrito. En este caso, el biosensor para la determinación de glutamina tiene co-inmovilizadas las enzimas *glutaminasa* y *glutamato deshidrogenasa*, que participan en la siguiente cadena de reacciones:



En tanto el biosensor para la determinación de glutamato tiene inmovilizada la enzima *glutamato deshidrogenasa*. Este sensor mide el glutamato presente en el medio de cultivo (*glutamato libre*), mientras que en el biosensor para la determinación de glutamina se miden tanto el glutamato presente en el medio como el generado a partir de la glutaminasa (*glutamato total*). De esta forma, la concentración de glutamina se obtiene como la diferencia entre la concentración de glutamato determinada por el biosensor para glutamina y la concentración de glutamato presente en la muestra.

3.5.4. **Determinación de la concentración de amonio**

El monitoreo de amonio en los sobrenadantes de cultivo celular se realiza

empleando una adaptación de la técnica desarrollada por Berthelot (1859) y modificada por Fawcett y Scott (1960) para la cuantificación de urea.

Los iones amonio presentes en la muestra se determinan mediante una serie de reacciones (Ngo y col., 1982): en medio alcalino, el equilibrio entre amonio y amoníaco se encuentra completamente desplazado hacia la formación del segundo, el cual reacciona con el ion hipoclorito para formar cloramina (NH_2Cl). En una reacción catalizada por nitroferricianuro de sodio [$\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$], se genera quinonacloramina a partir de cloramina y fenol (en su forma de anión), la cual vuelve a reaccionar con otro ion fenato para generar indofenol. El indofenol en medio alcalino se disocia dando *azul de indofenol*, compuesto fuertemente coloreado de azul que tiene un máximo de absorción a $\lambda=600$ nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de amonio presente en la muestra.

En primer lugar se preparó una curva de calibración entre 0 y 50 mM de iones NH_4^+ , empleándose diluciones de una solución concentrada de una sal de amonio (generalmente NH_4Cl). Las diluciones de la curva y las muestras se sembraron por triplicado en placa de microtitulación de 96 pozos, y finalmente se agregaron 100 μl por pozo de cada uno de los reactivos A y B, en ese orden. Se incubó la placa en oscuridad a 37°C durante 15 min y se leyó la absorbancia a $\lambda=540$ nm en un lector de placas de microtitulación Multiskan MCC/340[®] (Labsystems, Finlandia), dentro de la hora de finalizada la incubación. La concentración de amonio de cada muestra se obtuvo a partir del valor de la absorbancia medido por extrapolación en la recta de regresión lineal obtenida con los replicados de la curva de calibración.

Deben sembrarse volúmenes iguales de las diluciones de la curva de calibración y las muestras incógnita. En el caso de sembrarse entre 2-5 μl de las soluciones, la linealidad se mantiene hasta una concentración de 40 mM de NH_4^+ , valor que está dado por la saturación de la capacidad del lector. Sembrándose 10 μl de muestra, la curva es lineal hasta una concentración de 15 mM, y hasta una concentración de 10 mM, en el caso de sembrar 20 μl (resultados no mostrados).

Dado que la mayoría de los cultivos fueron realizados en modo *batch*, durante el cual suelen acumularse altos niveles de amonio, se decidió sembrar 10 μl de muestra en todos los casos.

3.5.5. Determinación de la osmolalidad

La determinación de la osmolalidad de los medios y sobrenadantes de cultivo se

determinó empleando un osmómetro de presión de vapor Vapro® (Wescor Inc., EE.UU.). El principio de funcionamiento de este equipo se basa en que el vapor de presión es una de las propiedades coligativas de una solución, las cuales son alteradas proporcionalmente al número de partículas disueltas de la misma.

3.6. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CELULARES ESPECÍFICOS

3.6.1. *Cálculo de la integral de células viables (ICV)*

Si $P_{(t)}$ representa la concentración de una especie y $X_{(t)}$ la concentración de células viables a un tiempo t , la variación de $P_{(t)}$ con respecto al tiempo está representada por la Ec. (9):

$$\frac{dP}{dt} = q_p X_{(t)} \quad (9)$$

En la Ec. (9), q_p es una constante asociada con la productividad de una línea celular definida, en un determinado conjunto de condiciones de cultivo. Integrando esta ecuación se tiene:

$$\int dP = q_p \int X_{(t)} dt \quad (10)$$

La Ec. (10) indica que la concentración de la especie en estudio en cualquier tiempo t es proporcional a la integral en el tiempo de la curva de células viables, o *Integral de Células Viables* (ICV, Renard y col., 1988). De esto se desprende que la curva de producción de la especie y la curva integral deben mostrar perfiles análogos y la regresión de una sobre la otra debe ser lineal. La ICV resulta así una medida de la cantidad de células metabólicamente activas (viables) presentes en un cultivo durante un período discreto de tiempo, y tiene unidades de **cél. h ml⁻¹**.

En este trabajo se asignará a cada tiempo de cultivo t_n un valor $ICV_{(t_n)}$, el cual corresponderá a la aproximación del área bajo la curva de concentración de células viables

en función del tiempo, desde el inicio del cultivo (t_0) hasta t_n . El área bajo esta curva se estimará de acuerdo con la siguiente expresión:

$$ICV_{(t_n)} = \int_{t_0}^{t_n} X_v dt = \sum_{t_0}^{t_n} \overline{X_v} (t_n - t_{n-1}) \quad (11)$$

en donde:

$$\overline{X_v} = \frac{X_{v(t_n)} + X_{v(t_{n-1})}}{2} \quad (12)$$

$\overline{X_v}$ es el promedio aritmético de X_v en el intervalo de tiempo $[t_{n-1}, t_n]$, expresado en **cél. ml⁻¹**. Por definición, $ICV_{(t_0)} = 0$.

3.6.2. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento celular (μ)

Considerando el balance de masa para la variable *número de células* en un cultivo *batch*:

$$\frac{dC}{dt} V = (\mu_r C - k_d C) V \quad (13)$$

En la Ec. (13), C es la concentración de células viables, V es el volumen del cultivo, μ_r es la velocidad específica de crecimiento real y k_d es la velocidad específica de muerte celular. Considerando V constante y reordenando la Ec. (13) se tiene:

$$\frac{dC}{dt} = (\mu_r - k_d) C \quad (14)$$

Dado que en un cultivo existe un permanente recambio de células (mientras unas se replican, otras mueren), definimos entonces a μ como la *velocidad específica de crecimiento* observada en el cultivo:

$$\mu = \mu_r - k_d \quad (15)$$

Para obtener el valor de μ se procede de la siguiente manera: a partir de los datos de recuento celular tomados diariamente se calcula la variación en la concentración de células viables ΔX_v para cada tiempo t_n , con respecto a la concentración inicial a tiempo t_0 , como se indica en la Ec. (16):

$$\Delta X_{(t_n)} = C_{(t_n)} - C_{(t_0)} \quad (16)$$

El valor de $\Delta X_{(t_n)}$ calculado para cada tiempo t_n se representa entonces en función de la $ICV_{(t_n)}$ correspondiente a ese mismo tiempo y se realiza el ajuste de los datos por regresión lineal. De esta forma se obtiene el valor de la velocidad específica de crecimiento μ , como el valor de la pendiente de la recta ajustada.

Casos particulares:

$$\text{a) } C_{(t_n)} - C_{(t_0)} = 0 \quad (17)$$

En este caso probablemente $\mu_r \approx k_d$, y el resultado neto es que no se observa variación en la concentración de células viables. Un claro ejemplo son los cultivos en perfusión, cuando el sistema ha alcanzado el estado estacionario.

$$\text{b) } C_{(t_n)} - C_{(t_0)} < 0 \quad (18)$$

En este caso $\mu_r < k_d$ y el resultado neto es la disminución en la concentración de células viables.

3.6.3. Cálculo de las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos (q_x)

Con los datos experimentales se calculan en primer lugar la variación en la concentración de los metabolitos con respecto a su concentración a tiempo t_0 , ya que éstos pueden ser consumidos y/o producidos durante el cultivo. Para ello se mide la concentración de la especie X al inicio del cultivo ($C_{(t_0)}$) y a cada tiempo n de cultivo ($C_{(t_n)}$), asignándosele al tiempo t_n el valor de variación $\Delta X_{(t_n)}$ de acuerdo con la Ec. (19).

$$\Delta X_{(t_n)} = |C_{(t_n)} - C_{(t_0)}| \quad (19)$$

Se determina así cuánto ha variado la concentración de la especie en estudio desde el inicio del cultivo hasta el día t_n . Si $C_{(t_n)} - C_{(t_0)} > 0$, entonces la especie ha sido producida durante el cultivo, y si $C_{(t_n)} - C_{(t_0)} < 0$, se ha consumido. En aquellos casos en que se produzca un cambio en el comportamiento metabólico de la célula con respecto a una especie – como ocurre con el lactato, el cual inicialmente se acumula en el medio de cultivo para luego disminuir progresivamente su concentración –, se considerará únicamente la variación de la especie en la primera fase del cultivo.

El valor de $\Delta X_{(t_n)}$ obtenido para cada tiempo t_n se representa en función de la $ICV_{(t_n)}$ asignada a ese tiempo y se realiza el ajuste de los datos por regresión lineal, incluyendo la mayor cantidad de datos experimentales que permita obtener un coeficiente de correlación $R \geq 0,95$, cuando fuera posible. La pendiente de la recta obtenida en cada caso es el valor de la velocidad específica de consumo o producción para cada una de las variables estudiadas, valores que caracterizan a los diferentes cultivos.

El criterio especificado para determinar la cantidad de datos que serán ajustados con el fin de obtener el valor de velocidad específica debe tenerse en cuenta cada vez que se realice el análisis de las curvas metabólicas. Si bien en términos absolutos el valor de velocidad específica de producción de un determinado metabolito en un determinado

cultivo A puede ser inferior al de otro cultivo B, la primera velocidad puede mantenerse constante por un tiempo mayor que la velocidad específica obtenida en el cultivo B, obteniéndose finalmente una mayor concentración de este metabolito en el cultivo A.

3.7. OBTENCIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 2B2 ANTI-rhEPO

La producción del anticuerpo monoclonal murino anti-rhEPO (Amadeo y col., 2004) que se utilizó en las diferentes técnicas inmunoquímicas para la detección de rhEPO se realizó de dos formas diferentes:

3.7.1. Producción *in vivo* del MAb 2B2

La producción *in vivo* del MAb 2B2 se llevó a cabo mediante la inoculación intraperitoneal del hibridoma productor en ratones BALB/c previamente tratados con ácido 2,6,10,14-tetrametilpentadecanoico (*Pristane*, Sigma, EE.UU.) por vía intraperitoneal. La concentración de inmunoglobulinas en el líquido ascítico fue determinada mediante un ELISA *sandwich* (Zenclussen, 2002).

3.7.2. Purificación del MAb 2B2 obtenido *in vivo*

La ascitis obtenida se purificó por cromatografía de afinidad a la Proteína A de *Staphylococcus aureus* (cepa Cowan I) siguiendo la metodología previamente descrita por Ey y col. (1978). Se empleó una columna con 5 ml de Sepharosa 4 FF-Proteína A (GE Healthcare, EE.UU.), en un equipo de cromatografía líquida de baja presión (FPLC®, GE Healthcare, EE.UU.) de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Equilibrado:

La columna se equilibró con 5 volúmenes de solución Tris-HCl 1 M, NaCl 3 M, pH 9.

2. Preparación y siembra de la muestra:

El líquido ascítico se ajustó a una concentración de NaCl 3 M, pH 9, mediante el agregado de NaCl sólido y de una solución de Tris-HCl 1 M, pH 9 en una relación 10:1. Se sembró un volumen de muestra apropiado según la capacidad de la matriz cromatográfica y la concentración de inmunoglobulinas presentes en el fluido ascítico, de acuerdo con la capacidad de la columna (10 mg de inmunoglobulinas por cada ml de gel).

3. Lavado:

Las proteínas no retenidas por la matriz cromatográfica fueron eliminadas mediante el lavado de la misma con solución de Tris-HCl 1 M, NaCl 3 M, pH 9, hasta demostrar la ausencia de proteínas en el eluido por medición espectrofotométrica de su absorbancia a $\lambda=280$ nm.

4. Elución:

Las inmunoglobulinas retenidas se eluyeron mediante la variación del pH de trabajo, producida por adición de una solución de ácido cítrico-NaOH 0,1 M, pH 3. El eluido se recogió en fracciones de 1 ml sobre 0,25 ml de solución de Tris-HCl 1 M, pH 9, con el fin de neutralizar el pH, y se determinó la absorbancia de las alícuotas a $\lambda=280$ nm.

El flujo establecido durante la distintas etapas del proceso cromatográfico fue de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Las fracciones correspondientes al pico de elución de inmunoglobulinas fueron mezcladas y el producto obtenido fue dializado contra PBS empleando membrana de diálisis de 10 kDa de límite de exclusión (Sigma, EE.UU.). Se determinó la concentración del producto purificado mediante un ELISA específico indirecto y se lo conservó a -20°C . El MAb 2B2 purificado se empleó en la sensibilización de las placas de ELISA para la cuantificación de rhEPO.

3.7.3. Producción in vitro del MAb 2B2

Se cultivó el hibridoma productor en suspensión, empleando el medio de cultivo descrito en la sección 3.2.6. El cultivo se realizó en modo *batch* en frascos *spinner*, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, momento en el que se centrifugó la suspensión celular 5 min a 400 *g*. La concentración de inmunoglobulinas en el sobrenadante de cultivo se cuantificó mediante un ELISA específico indirecto (Oggero Eberhardt, 2002), y el sobrenadante crudo diluido convenientemente se utilizó para el reconocimiento de la molécula de EPO adsorbida sobre membranas de nitrocelulosa por las técnicas de *immunodot* y *Western blot*.

3.8. MÉTODOS DE SCREENING Y CUANTIFICACIÓN DE rhEPO

3.8.1. Técnica de immunodot

La técnica de *immunodot* se empleó para semicuantificar la EPO presente en el

sobrenadante de cultivo de los clones productores - en los días posteriores al clonado en placas de 96 pozos - cuando se contaba con volúmenes pequeños de muestra.

Para realizar esta técnica se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

1. Siembra:

La siembra de estándar y muestras se realizó sobre una membrana de nitrocelulosa (MSI-OSMONIC, EE.UU.), empleando un sistema de filtración múltiple por pozos *Hybridot* (Life Technologies, Reino Unido) conectado a una bomba de vacío (Millipore, Francia).

Estándar: Se adsorbieron 10 μl de diluciones sucesivas en medio de cultivo del estándar de rhEPO, desde una concentración de 34,50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ hasta 0,03 ng ml^{-1} .

Muestras: Se adsorbieron 10 μl de las muestras de sobrenadante.

2. Lavado:

Se realizaron tres lavados sucesivos, en agitación, por inmersión de la membrana de nitrocelulosa en *buffer* salino de Tris (TBS).

3. Bloqueo:

Se bloquearon los sitios de unión inespecífica de la membrana sumergiéndola en solución de bloqueo. Se incubó 1 h a TA, en agitación.

4. Lavado: Idem paso 2.

5. Primera reacción inmuno-específica:

Se sumergió la membrana en una dilución del sobrenadante crudo del MAb 2B2 en solución diluyente. Se incubó 1 h a TA, en agitación.

6. Lavado: Idem paso 2.

7. Reacción inmuno-específica de detección:

Se sumergió la membrana en una solución de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO, Dinamarca) en una dilución 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó 1 h a TA, en agitación.

8. Lavado: Idem paso 2.

9. Reacción de revelado:

Se empleó H₂O₂ como sustrato de la enzima (solución A de revelado), la cual se mezcló en el momento de usar con la solución B de revelado conteniendo el reactivo cromogénico. La reacción de color se detuvo realizando lavados con agua.

En presencia de EPO se desarrolla una mancha de color azul en el punto de siembra, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de la molécula. De esta forma es posible semicuantificar las muestras por comparación visual del color generado con respecto al producido por los testigos de concentración conocida, siendo el límite de detección de la técnica de 0,0625 µg ml⁻¹.

3.8.2. Técnica de ELISA

Para la determinación de la concentración de la molécula de rhEPO presente en distintos entornos (diferentes medios de cultivo, molécula purificada), se empleó un enzimoimmunoensayo tipo *sandwich* desarrollado en nuestro laboratorio (Amadeo y col., 2004), el cual reconoce todas las isoformas de esta proteína. El rango lineal de este ensayo es de 0,125 µg ml⁻¹ a 4 µg ml⁻¹.

1. Reacción de sensibilización:

Una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner Bio-One, Alemania) se sensibilizó con 100 µl por pozo de una solución de MAb 2B2 purificado de una concentración de 1 µg ml⁻¹ diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C.

2. Lavado: Se realizaron seis lavados sucesivos de la placa, con solución de lavado.

3. Bloqueo:

El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 µl por pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37°C.

4. Primera reacción inmunespecífica:

Estándar: Se sembraron 100 µl por pozo de diluciones sucesivas del estándar de rhEPO, desde una concentración de 4 µg ml⁻¹ hasta 31,25 ng ml⁻¹.

Muestras: Se sembraron 100 µl por pozo de diluciones sucesivas de las muestras a cuantificar.

Se incubó la placa 1 h a 37°C.

5. Lavado: Idem paso 2.

6. Segunda reacción inmuno-específica:

Se adicionaron 100 µl por pozo de suero policlonal de conejo anti-rhEPO obtenido en nuestro laboratorio en una dilución 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.

7. Lavado: Idem paso 2.

8. Reacción inmuno-específica de detección:

Se agregaron 100 µl por pozo de una solución de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO, Dinamarca) en una dilución 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.

9. Lavado: Idem paso 2.

10. Reacción de revelado:

Se empleó H₂O₂ como sustrato de la enzima, diluida en solución de revelado, la cual contenía el reactivo cromogénico. Se agregaron 100 µl por pozo de esta dilución, y la placa se incubó en oscuridad a TA durante 10 min. En presencia de EPO la solución adquiere un color amarillo-marrón, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de la molécula. La determinación de la absorbancia de las muestras se realizó a $\lambda=450$ nm en lector de placas de microtitulación.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda.

3.9. DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE ISOFORMAS DE rhEPO: ISOELECTROENFOCADO (IEF)

El estudio de la composición porcentual de isoformas de rhEPO puede realizarse mediante la técnica de focalización isoelectrónica o isoelectroenfocado, para la que se utilizó el sistema de GE Healthcare (EE.UU.), compuesto por una cuba electroforética Multiphor II, un baño refrigerante Multitemp III y una fuente de voltaje EPS3500XL.

El gel utilizado en el isoelectroenfocado consistió en una mezcla de acrilamida/bisacrilamida en una concentración del 8% (P/V), urea 7 M, anfolitos de rangos de pH 3-10 y 2,5-5 (GE Healthcare, EE.UU.), APS 0,1% (P/V), TEMED 0,1% (V/V) con el fin de obtener un gel en el cual se estableciera posteriormente un gradiente de pH comprendido entre 3 y 10.

Una vez preparado el soporte, se procedió al preenfocado de los anfolitos durante 1 h a 2.000 V, 100 mA, 10 W, 10°C, con el objeto de generar el gradiente de pH. Este

gradiente se estableció al generar un campo eléctrico entre dos tiras de papel de electrodo (GE Healthcare, EE.UU.), embebidas en solución de anolito y catolito, respectivamente. Posteriormente, se sembraron las muestras de rhEPO parcialmente purificadas, en una cantidad de masa proteica apropiada acorde con el modo de revelado posterior (20 µg para tinción con azul brillante de *Coomasie*, y entre 0,3 y 0,6 µg para revelado por *Western blot*, en un volumen máximo de 25 µl). Se procedió al enfocado de las muestras durante 30 min, en idénticas condiciones de corrida.

3.9.1. Tinción con azul brillante de Coomasie

La tinción de las bandas con azul brillante de *Coomasie* se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Fijación del gel:

Se incubó el gel en solución fijadora durante 30 min en agitación.

2. Acondicionamiento del gel:

Se incubó el gel en solución de desteñido durante 1 h en agitación.

3. Tinción del gel:

Se incubó el gel en solución colorante durante 30 min en agitación.

4. Eliminación del background de tinción:

El gel fue desteñido por difusión pasiva con solución de desteñido hasta que se visualizaron bandas azules nítidas contra un fondo claro, renovando periódicamente la solución.

3.9.2. Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa

El sistema de transferencia utilizado fue el denominado *sistema seco*, en el cual la membrana y los papeles de filtro empleados se encuentran embebidos en solución de electrotransferencia y el proceso se realiza sobre un soporte seco.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (MSI-OSMONIC, EE.UU.) empleando el equipo de GE Healthcare descrito en el ítem 3.9. La transferencia se llevó a cabo durante 1 h a TA, a 2.000 V y 10 W, y usando la relación 0,8 mA cm⁻² de superficie de membrana. La transferencia se evaluó coloreando la membrana con solución de rojo *Ponceau*, la cual se decoloró con sucesivos lavados con TBS.

3.9.3. Western blot

La proteína adsorbida sobre la membrana de nitrocelulosa se reveló mediante la reacción inmunoquímica descrita en la técnica de *immunodot* (sección 3.8.1).

3.9.4. Densitometría de bandas

La determinación del porcentaje relativo de isoformas presentes en las muestras analizadas por isoelectroenfocado se realizó mediante la densitometría de las bandas. Se procedió a capturar la imagen con el *scanner* PowerLook III (UMAX Technologies, EE.UU.), ya sea del gel teñido con azul brillante de *Coomasie* o de la membrana de nitrocelulosa revelada inmunoquímicamente. La densitometría de las bandas se realizó empleando el *software* ImageMaster™TotalLab (GE Healthcare, EE.UU.). De esta forma se determinó el contenido relativo de cada isoforma, expresándolo como porcentaje.

En la Fig. 6 se muestra un ejemplo de este análisis para una muestra de rhEPO.

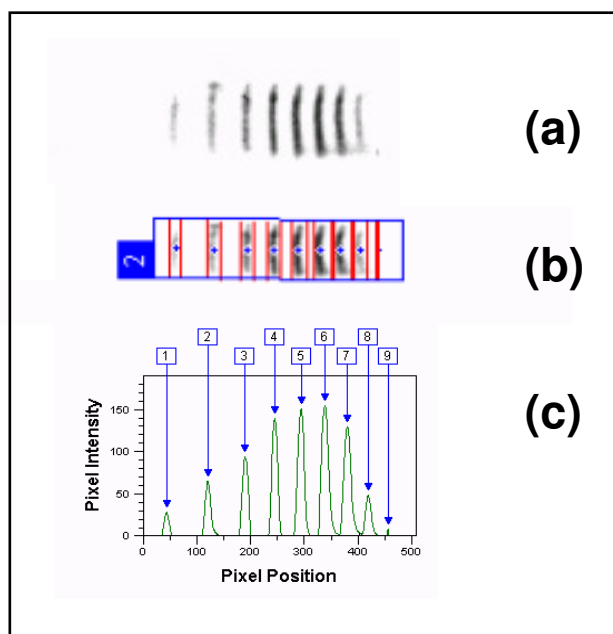


Fig. 6: Análisis de una muestra de rhEPO por IEF seguido de *Western blot* y densitometría de bandas: (a) Imagen de la membrana revelada inmunoquímicamente, (b) identificación de las bandas y (c) densitograma generado por el *software*.

3.10. PURIFICACIÓN DE rhEPO

Para lograr una óptima *performance* de las corridas de isoelectroenfoco las muestras deben encontrarse en concentración suficiente y en un entorno de muy bajo

contenido de sales, ya que una fuerza iónica elevada altera el perfil de corrida (García Pérez, 2000).

Por lo tanto, debe elegirse un sistema de purificación en un paso que permita la recuperación de todas las isoformas presentes originalmente en el medio de cultivo, libres de sales y en una concentración adecuada, a partir de volúmenes variables de muestra.

Para la purificación y concentración de las muestras de sobrenadante de cultivo se emplearon dos sistemas de ultracentrifugación:

3.10.1. Purificación y concentración de volúmenes pequeños

Los filtros para ultracentrifuga Ultrafree-MC[®] (Amicon-Millipore, EE.UU.) se utilizan en la purificación y concentración de soluciones acuosas, en volúmenes pequeños. El material empleado en estos filtros es celulosa regenerada de baja unión a proteínas, cuyo límite nominal es de 10 kDa. El protocolo general seguido cuando se emplearon estos filtros para purificar y concentrar muestras de rhEPO provenientes tanto de sobrenadante como del eluato de los filtros Ultrafree-MC[®] se detalla a continuación:

1. Acondicionamiento previo al uso del filtro:

Se realizó un lavado con agua ultrapura durante 8 min a 2.500 g, con el fin de eliminar el agente humectante (trietilenglicol) presente en la membrana. El volumen retenido, así como el permeado, fueron descartados.

2. Concentración por ultrafiltración:

Se colocó el volumen máximo permitido (450 μ l) de sobrenadante de cultivo en el filtro, centrifugándose 30 min a 2.500 g y a 4°C. Una vez finalizado el tiempo de centrifugación se retiró el permeado (el que se conservó como control a -20°C), y se homogeneizó cuidadosamente con micropipeta el volumen retenido - para minimizar la formación de espuma -, con el fin de evitar que las proteínas se depositaran sobre el filtro y lo taparan.

Se agregó luego un volumen apropiado de sobrenadante de cultivo para completar el volumen del filtro y se centrifugó en idénticas condiciones a las descriptas. Este proceso se repitió las veces necesarias hasta concentrar el volumen inicial de 1,5 ml de sobrenadante a 250 μ l.

3. Diafiltración:

Una vez concentrado el sobrenadante de cultivo, se le agregó un volumen suficiente de

agua ultrapura para completar 450 μ l y se centrifugó 30 min a 2.500 g y a 4°C. Finalizado este tiempo, se descartó el permeado, se homogeneizó el volumen retenido y se adicionó nuevamente agua a la muestra. Este proceso se repitió tantas veces como fuera necesario para disminuir el contenido de sales a 1/30 de su valor inicial.

4. Concentración final:

Cuando se consideró que la concentración de sales y pequeñas moléculas en el volumen retenido era aceptable, se realizó el paso final de concentración de la muestra. Para ello se centrifugó la muestra a 2.500 g y a 4°C el tiempo suficiente para obtener un volumen final entre 200 μ l y 450 μ l. La muestra se homogeneizó y se conservó a -20°C, hasta su análisis por ELISA e IEF.

5. Acondicionamiento final del filtro:

La sanitización de los filtros usados se realizó como se indica a continuación:

- Lavado con agua ultrapura 8 min a 2.500 g
- Lavado con NaOH 0,1 M 20 min a 2.500 g
- Lavado con agua ultrapura 20 min a 2.500 g (dos veces)
- Lavado con etanol 20% (V/V) 5 min a 2.500 g

Los filtros se conservaron en etanol 20% (V/V) a 4°C.

El *pool* de permeados recolectados durante el paso 2 se analizó siempre por ELISA para evaluar la integridad del filtro, determinando la cantidad de rhEPO que pudiera haber pasado a través del filtro. En todos los casos esta determinación presentó valores de absorbancia similares al control negativo del ensayo.

3.10.2. Purificación y concentración de volúmenes medios

Los filtros para ultracentrifugación Centriplus® (Amicon, Millipore, EE.UU.) son utilizados para concentrar y purificar fluidos biológicos y soluciones acuosas en volúmenes que van de 2 ml a 15 ml. El límite de corte nominal de estos filtros es de 10 kDa.

El protocolo seguido para concentrar muestras de sobrenadante conteniendo rhEPO se indica a continuación:

1. Acondicionamiento previo al uso del filtro:

Se realizó un lavado con agua ultrapura durante 5 min a 2.000 g , para eliminar el glicerol presente en trazas en la membrana. Se descartaron el volumen retenido y el permeado.

2. Concentración por ultrafiltración:

Se colocaron 15 ml de la muestra de sobrenadante de cultivo en el filtro y se centrifugó por 2 h a 3.000 *g* y a 4°C. Una vez finalizado el tiempo de centrifugación se retiró el permeado acuoso concentrado en sales y se congeló a -20°C para ser luego analizado. El volumen retenido fue cuidadosamente homogeneizado con micropipeta, evitando que se genere espuma, para resuspender las proteínas que se hubieran depositado sobre la membrana de filtración.

Se agregó luego más sobrenadante de cultivo para completar 15 ml y se centrifugó en idénticas condiciones a las descriptas. Se repitió este proceso las veces necesarias para obtener el volumen deseado.

3. Diafiltración:

Se agregó agua ultrapura al sobrenadante de cultivo concentrado hasta un volumen de 15 ml y se centrifugó 2 h a 3.000 *g* y a 4°C. Finalizado este tiempo, se descartó el permeado, se homogeneizó el volumen retenido y se agregó más agua ultrapura a la muestra. Este proceso se repitió de una a tres veces, dependiendo del procesamiento posterior de la muestra.

4. Elución:

Para recuperar la muestra concentrada y purificada se invirtió la parte superior del filtro sobre el vial de recolección y se centrifugó 4 min a 2.000 *g* y a 4°C para que las proteínas adsorbidas sobre la membrana pasasen al eluato. La muestra se homogeneizó, y se continuó con su procesamiento (utilizando los filtros Ultrafree-MC®) o se conservó a -20°C, para su análisis posterior.

5. Acondicionamiento final del filtro:

Con el fin de sanitizar y conservar los filtros usados, se realizó el siguiente procedimiento:

- Lavado con agua ultrapura 8 min a 2.500 *g*
- Lavado con NaOH 0,1 M 30 min a 2.500 *g*
- Lavado con agua ultrapura 30 min a 2.500 *g* (dos veces)
- Lavado con etanol 20% (V/V) 5 min a 2.500 *g*

Los filtros se conservaron en etanol 20% (V/V) a 4°C.

De igual manera a la descrita para los filtros Ultrafree-MC® el *pool* de permeados recolectados durante la ultracentrifugación fue analizado por ELISA, obteniéndose resultados satisfactorios en todos los casos.

Dependiendo de la concentración de rhEPO requerida, el eluato de esta ultrafiltración era directamente utilizado como sustrato por las diferentes técnicas de análisis o sufría un nuevo proceso de concentración utilizando los filtros Ultrafree-MC®.

3.11. REACTIVOS QUÍMICOS Y SOLUCIONES

3.11.1. Soluciones empleadas para el recuento y el subcultivo de células

Solución colorante: Azul de tripán 0,4% (P/V) en PBS.

Solución de tripsina: Tripsina 2,5 g l⁻¹, EDTA 0,04 g l⁻¹ en PBS.

3.11.2. Reactivos empleados en la determinación de amonio

Reactivo A: Solución acuosa de fenol 487,6 mM, nitroferriicianuro de sodio 1 mM.

Reactivo B: Solución acuosa de hipoclorito de sodio 33,3 mM, hidróxido de sodio 562,5 mM.

3.11.3. Soluciones empleadas en el inmunodot para la semicuantificación de rhEPO

Solución de bloqueo: BSA 1% (P/V) en TBS

Solución diluyente: BSA 0,1% (P/V) en TBS

Solución A de revelado: H₂O₂ (30 vol.): TBS (1:200). La solución debe prepararse en el momento de su uso.

Solución B de revelado: α-cloronaftol 0,25% (P/V) en metanol. La solución debe prepararse en el momento de su uso.

3.11.4. Soluciones empleadas en el ELISA para la cuantificación de rhEPO

Solución de sensibilización: Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6

Solución de lavado: Tween 20 0,05% (V/V) en PBS

Solución de bloqueo: BSA 1% (P/V) en PBS

Solución diluyente: BSA 0,1% (P/V), Tween 20 0,05% (V/V) en PBS

Solución de revelado: H₂O₂ 0,12% (V/V), *o*-fenilendiamina (OPD) 3 mg ml⁻¹ diluidos en el momento de su uso en una solución de citrato de sodio 50 mM, fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3.

3.11.5. Soluciones empleadas en el isoelectroenfocado de rhEPO

Solución de anolito: Ácido glutámico 100 mM, ácido fosfórico 17,1 mM.

Solución de catolito: L-alanina 100 mM.

3.11.6. Soluciones empleadas en la tinción de proteínas

Solución de electrotransferencia: Glicina 192 mM, metanol 20% (V/V), Tris 25 mM, pH 8,3.

Solución de rojo Ponceau: Rojo *Ponceau* 0,25% (P/V), ácido acético glacial 15% (V/V), metanol 40% (V/V).

Tinción con azul brillante de Coomasie:

-*Solución de fijación:* Ácido tricloroacético 10% (P/V), ácido sulfosalicílico 3,5% (P/V) en solución de desteñido.

-*Solución de desteñido:* Metanol 40% (V/V), ácido acético 10% (V/V)

-*Solución de tinción:* *Coomasie Blue* R-250 0,125% (P/V), metanol 40% (V/V), ácido acético 10% (V/V).

3.11.7. Soluciones varias

Solución estándar de rhEPO: En todas las técnicas en que se requirió una solución de rhEPO para ser utilizada como estándar, se emplearon estándares internos del laboratorio contrastados previamente frente al estándar internacional BRP indicado por la Farmacopea Europea.

Buffer salino de fosfatos (PBS): KH₂PO₄ 0,6 g l⁻¹, Na₂HPO₄ 0,78 g l⁻¹, NaCl 8,8 g l⁻¹, pH 7,3.

Buffer salino de Tris (TBS): Tris 0,05 M, NaCl 0,015 M, pH 7,5.

4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

CAPÍTULO 1

4. OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ADAPTACIÓN A SUSPENSIÓN DE UN CLON PRODUCTOR DE rhEPO

4.1. OBJETIVOS

En esta primera etapa se plantearon como objetivos:

- Obtener clones productores de rhEPO y realizar una pre-selección de ellos.
- Caracterizar el crecimiento, productividad y el perfil glicosídico de la molécula producida por estos clones.
- Seleccionar dos de estos clones y adaptarlos al crecimiento en suspensión, en medios de cultivo reducidos en suero y medios de cultivo libres de proteínas.
- Caracterizar el crecimiento, productividad y el perfil glicosídico de la molécula producida por los clones adaptados.
- Seleccionar el clon productor de rhEPO a ser utilizado en las experiencias posteriores.

4.2. INTRODUCCIÓN

Cuando se tiene como objetivo la optimización del proceso de producción de una glicoproteína desde el punto de vista del cultivo de las células de mamífero productoras, la adecuada selección del clon celular es de fundamental importancia. En particular, el clon recombinante a ser utilizado en la producción a escala industrial de la rhEPO debe cumplir, idealmente, con los siguientes requerimientos:

- Presentar una alta velocidad de crecimiento que lleve a una alta concentración celular.
- Producir bajos niveles de metabolitos potencialmente inhibidores del crecimiento y/o perjudiciales para la calidad glicosídica de la molécula de rhEPO.
- Presentar una alta velocidad específica de producción de rhEPO.
- Producir un conjunto de isoformas de rhEPO de alto contenido de ácido siálico.

Una vez seleccionado el clon productor, el siguiente paso es su adaptación al crecimiento en suspensión, una etapa fundamental cuando se persigue la utilización de ese clon en un proceso de producción a escala industrial.

Si bien actualmente existen procesos industriales realizados en base al cultivo en adherencia de las células (ya sea que se empleen *roller bottles* o *microcarriers*), el

escalamiento de estos procesos resulta proporcionalmente más caro y con mayor dificultad desde el punto de vista del equipamiento y personal requerido. Leist y col. (1990) presentan en su revisión un muy completo estudio comparativo de ambos sistemas de cultivo, bajo diferentes condiciones de operación.

Considerando que es posible obtener entre 300.000 y 400.000 cél. cm^{-2} , un frasco *roller* de superficie expandida (1.700 cm^2) puede proveer aproximadamente 6×10^8 células por frasco. En un biorreactor de 50 l en el cual se alcanzan 2×10^7 cél. ml^{-1} se obtienen entonces 1×10^{12} células, lo que equivale a 1.600 frascos *roller*, es decir, 1.600 unidades independientes de cultivo. El rendimiento en producto, por otro lado, es al menos dos veces superior al que se obtiene en cultivos adherentes (Pereira Bacci y col., 1999), debido principalmente a la homogeneidad de las condiciones del entorno celular y al estricto control ejercido en forma automática sobre las variables del sistema. Dado que el objetivo final de este trabajo de tesis es la optimización del proceso de producción de rhEPO, el cual se realiza en un biorreactor tipo tanque agitado con perfusión, utilizando un modo de cultivo continuo, la adaptación exitosa de los clones seleccionados al crecimiento en suspensión resulta imprescindible.

El estudio del metabolismo celular también es de gran importancia durante el proceso de selección del clon productor, especialmente la determinación de las velocidades específicas de crecimiento, de consumo de nutrientes y de producción de catabolitos, incluyendo la rhEPO. En este trabajo, estos valores se obtuvieron siempre a partir del gráfico de la variable de interés versus la integral de células viables (ICV), según se describe en la sección Materiales y Métodos.

El cálculo de la integral de células viables (ICV) como un parámetro del cultivo se basa en la premisa de que solamente las células viables son las responsables de la variación en la concentración de ciertas especies (nutrientes, catabolitos excretados, proteína de interés), y que la velocidad de producción (o consumo) de una determinada especie es constante bajo un determinado conjunto de condiciones (Renard y col., 1988). En los últimos años se ha verificado una tendencia creciente a utilizar la ICV para el cálculo de las velocidades específicas de consumo de nutrientes y producción de catabolitos (Altamirano y col., 2001a, 2004, 2006a, 2006b; Yang y Butler, 2000a, 2000b, 2000c; deZengotita y col., 2002b; Tsao y col., 2005; Yoon y col., 2005; Restelli y col., 2006).

No sólo en el caso del cálculo de las velocidades metabólicas específicas es que se requiere determinar la relación existente entre dos variables asociadas al cultivo del clon en estudio. Como se verá más adelante, en este trabajo de tesis se ha establecido la correlación existente entre diferentes variables (por ejemplo, la osmolalidad del medio

empleado y la calidad de la molécula de rhEPO producida, o el modelado de una variable que depende de los nutrientes del medio de cultivo), con el fin de caracterizar el comportamiento metabólico del clon frente a alteraciones en el entorno celular.

El objetivo, entonces, de estudiar la correlación entre dos variables X e Y (o más) es determinar *en qué medida* una ecuación (lineal u otra) describe o explica de una forma adecuada la relación existente entre estas variables.

El análisis de los gráficos de dispersión – gráficos que muestran la localización de los puntos (x, y) en un sistema de coordenadas cartesianas – permite *a priori* suponer la existencia o no de correlación entre las variables, de una manera cualitativa. Si se tiene un número suficiente de puntos y pueden construirse tablas de frecuencia, por ejemplo, el estadístico χ^2 (ji-cuadrado) permite establecer cuantitativamente la existencia de correlación entre X e Y con un nivel de significancia definido.

Una vez establecido cuali o cuantitativamente que existe un grado de relación entre las variables, se intenta *modelar* esta relación. El modelado es la búsqueda de una función analítica o un procedimiento (el *modelo*) del cual se obtendrá un conjunto de variables de salida Y a partir de un determinado conjunto de datos de ingreso X (Zupan y Gasteiger, 1999).

En la práctica se ajustan los datos mediante la construcción de una curva (generalmente siguiendo el método de cuadrados mínimos, *Least Squares Method* - LSD). Este procedimiento da como resultado la ecuación de la curva ajustada, sus parámetros y el error en la estimación de estos parámetros.

Finalmente es necesario estimar la bondad del ajuste realizado, para lo cual pueden utilizarse diferentes funciones de mérito (Bevington y Robinson, 1993). En este trabajo de tesis se utilizará como función de mérito el llamado *coeficiente de correlación R*.

4.2.1. **Coeficiente de correlación R**

Además de los puntos experimentales (x, y) , luego de ajustar una curva se tendrán los puntos (x, y_{est}) , en donde y_{est} son los valores estimados o ideales de la variable Y sobre la curva ajustada. La *variación total de la variable Y* , también llamada *suma de cuadrados total* (SS_T , *Total Square Sum*), se define como la suma de los cuadrados de las desviaciones de los valores de Y respecto de su media \bar{Y} , según:

$$SS_T = \sum (y - \bar{Y})^2 \quad (20)$$

Puede también demostrarse que:

$$\sum (y - \bar{Y})^2 = \sum (y_{est} - \bar{Y})^2 + \sum (y - y_{est})^2 \quad (21)$$

El primer término del segundo miembro de esta ecuación se denomina *variación explicada* por el modelo o según otros textos *suma de cuadrados debida a la regresión*, mientras que el segundo término se conoce como *variación no explicada* o *suma de cuadrados residual*. La denominación *variación explicada* alude a que las desviaciones $(y_{est} - \bar{Y})$ tienen un patrón definido, en tanto las desviaciones $(y - y_{est})$ – la *variación no explicada* por el modelo – se comportan de forma aleatoria o no previsible (Spiegel, 1980).

El cociente entre la suma de cuadrados debida a la regresión $\sum (y_{est} - \bar{Y})^2$ y la suma de cuadrados total $\sum (y - \bar{Y})^2$ se conoce como *coeficiente de determinación* R^2 , y varía entre 0 y 1. El *coeficiente de correlación* R se define entonces como:

$$R = \pm \sqrt{R^2} = \pm \sqrt{\frac{\sum (y_{est} - \bar{Y})^2}{\sum (y - \bar{Y})^2}} \quad (22)$$

El coeficiente de correlación R varía entre -1 y 1. Los signos \pm se utilizan para indicar una correlación lineal positiva o negativa. Este coeficiente es adimensional y su definición es general, por lo que puede aplicarse tanto relaciones lineales como a no lineales.

El coeficiente R mide la bondad de ajuste de los datos experimentales a la ecuación supuesta, estimando la fracción de la variabilidad de los datos que es explicada por el modelo. Cuanto más se acerque a la unidad (en términos de valor absoluto), mejor es el modelo elegido. Si bien R no indica significancia estadística, bajo ciertas condiciones puede calcularse la probabilidad P de que el valor R obtenido se deba al azar, o dicho de otra forma, la probabilidad de que el valor de R sea cero.

En este trabajo se presentarán ambos valores, R y P , como estimadores de la bondad del ajuste realizado sobre las variables en estudio, en las experiencias realizadas.

4.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Inicialmente se evaluó la productividad y se realizó el clonado de líneas celulares adherentes productoras de rhEPO. Luego de realizar un *screening* de la productividad de los clones, se continuó con el estudio de siete de ellos. El metabolismo de estos clones fue analizado en términos de sus parámetros específicos, lo que permitió seleccionar dos clones para proseguir con su estudio.

Los clones seleccionados fueron posteriormente adaptados a crecer en suspensión en frascos tipo *spinner*, tanto en medios de cultivo adicionados de suero fetal bovino como medios definidos libres de proteína. Se caracterizó luego su crecimiento y productividad con el fin de evaluar el posible efecto de este proceso de adaptación sobre el metabolismo celular. Este análisis derivó en la selección del clon productor.

El estudio metabólico de los clones se realizó mediante la determinación de los siguientes parámetros metabólicos específicos:

- La velocidad específica de crecimiento (μ) y la densidad celular máxima alcanzada.
- La velocidad específica de consumo de glucosa (q_{glc}) y la eficiencia en el uso de la glucosa, definida como el rendimiento de lactato a partir de este azúcar ($Y_{lac/gluc}$).
- La velocidad específica de consumo de glutamina (q_{gln}) y la eficiencia en el uso de la glutamina, definida como el rendimiento de amonio derivado de este aminoácido ($Y_{am/gln}$).
- La velocidad específica de producción de glutamato (q_{glu}), lactato (q_{lac}) y amonio (q_{am}), y la concentración máxima de estos catabolitos alcanzada durante el cultivo.
- La velocidad específica de producción de rhEPO (q_{rhEPO}) y la concentración máxima de esta proteína determinada al finalizar los cultivos.

La caracterización de la proteína recombinante producida por los diferentes clones se realizó mediante la técnica electroforética conocida como *isoelectroenfocado*, la cual permite la separación de proteínas basada en sus diferentes puntos isoelectrónicos. Posteriormente, las bandas obtenidas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se pusieron en evidencia por una reacción inmunoquímica.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Cultivo de líneas celulares productoras de rhEPO

El procedimiento de obtención de nuevos clones productores de rhEPO se inició con el cultivo de 10 líneas de células CHO.K1 transfectadas, denominadas P2B1, P2B2,

P2B4, P2C1, P2C2, P2C3, P2C4, P2C6, P2D1 y P2D2, obtenidas previamente en el laboratorio.

Estas líneas celulares fueron descongeladas y cultivadas en frascos T de 25 cm² utilizando para ello medio de cultivo estándar con alto contenido de glucosa y glutamina (MCE-AGG) adicionado de 5% (V/V) SFB y 400 µg/ml de Geneticín. Este último se utilizó para presionar la selección de aquellos clones que hubieran incorporado un número alto de plásmidos con el gen de interés, ya que induce el mecanismo de apoptosis en aquellas células que no poseen el plásmido (Tey y col., 2000).

4.4.2. Determinación de la productividad específica de rhEPO

Con el fin de caracterizar las líneas en cultivo, se determinó la productividad específica de rhEPO de las mismas, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Las células provenientes de las líneas en estudio se cultivaron en MCE-AGG al 5% (V/V) SFB, hasta alcanzar la confluencia. Se retiraron entonces los sobrenadantes de cultivo, reemplazándolos por MCE-AGG al 0,1% (V/V) SFB de manera de generar un entorno celular de características análogas a las de un proceso de producción a escala industrial. La baja concentración de SFB y la restricción en la superficie disponible para que la monocapa se extienda inducen a que el crecimiento de las células se detenga, ya que estas células no han sido previamente adaptadas al crecimiento en estas condiciones. De esta forma las células se mantienen en la fase G1 del ciclo celular, destinando la mayor parte de su energía al mantenimiento de la viabilidad (y la producción de rhEPO) y no a la replicación.

Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones durante 72 h, momento en el cual se realizó el recuento celular y se determinó por ELISA la concentración de rhEPO en los sobrenadantes del cultivo. Asumiendo una velocidad de crecimiento prácticamente nula y realizando el cociente entre la concentración de rhEPO y la concentración celular, se obtuvo la velocidad específica de producción de rhEPO de estas líneas.

Los datos de q_{rhEPO} se presentan en la Tabla VII. La concentración de rhEPO se expresa en este trabajo en unidades de % ml⁻¹, en tanto la q_{rhEPO} se indica en unidades de % 10⁻⁶ cél⁻¹ h⁻¹. Para convertir los resultados experimentales a estas unidades, se definió un valor de masa de rhEPO de 100 µg como 100%.

Los valores más altos de q_{rhEPO} se obtuvieron para las líneas P2B1 y P2C4 (0,088 y 0,067 % 10⁻⁶ cél.⁻¹ h⁻¹, respectivamente).

Tabla VII: Valores de q_{rhEPO} calculados para las 10 líneas celulares.

Línea celular	q_{rhEPO} (% 10^6 cél. $^{-1}$ h $^{-1}$)
P2B1	0,088
P2B2	0,042
P2B4	0,021
P2C1	0,025
P2C2	0,033
P2C3	0,033
P2C4	0,067
P2C6	0,021
P2D1	0,004
P2D2	0,008

4.4.3. Clonado de líneas celulares productoras de rhEPO y selección de clones

Una línea celular puede estar constituida por más de un clon, los cuales varían en su crecimiento, número de copias del gen de interés y productividad, entre otros parámetros. Con el objeto de individualizar estos clones, caracterizarlos y seleccionar luego los más aptos, se llevó a cabo el clonado de las líneas celulares en estudio. Del conjunto pre-seleccionado se eligió luego un clon particular, el cual fue empleado en los estudios posteriores que se presentan en este trabajo.

A partir de cultivos de las líneas celulares que se encontraban en fase de crecimiento exponencial se procedió a realizar el clonado de las mismas, mediante el *método de dilución límite* en placas de 96 pozos. Para ello se sembraron 200 μ l por pozo de cada suspensión de células en medio MCE-AGG al 20% (V/V) SFB y 400 μ g ml $^{-1}$ de Geneticín. El alto contenido de SFB es necesario para aportar los factores de crecimiento que permitan a las células crecer y formar una colonia a partir de una única célula madre.

Como resultado de este procedimiento se obtuvieron entre 10 y 30 clones por línea, con un total de 171 clones. Sin embargo, no todos los clones fueron capaces de mantener una velocidad de crecimiento adecuada, o murieron, por lo que éstos no fueron incluidos en este estudio, reduciéndose así su número a 145. Los clones fueron identificados al igual que las líneas celulares con dos letras y dos números. La primera letra y el primer número del nombre de cada clon correspondieron a la última letra y el último número de la línea que le dio origen.

Una vez que las colonias monoclonales mostraron un crecimiento sostenido, cubriendo aproximadamente una tercera parte del pozo de cultivo, se reemplazó el

sobrenadante de cada pozo por 200 μ l de MCE-AGG al 5% (V/V) SFB. En la medida en que estos cultivos alcanzaban un estado de confluencia, se procedió a estimar la productividad de los clones, mediante la técnica de *immunodot*. Esta técnica permite semicuantificar la concentración de rhEPO cuando los volúmenes de muestra son muy pequeños, como en este caso. Asumiendo una concentración de células similar en todos los cultivos (una monocapa confluyente), esta metodología permitió discriminar los clones más productores de aquéllos de producción muy baja o nula.

Como resultado de este primer *screening* se seleccionaron 18 clones, los cuales fueron amplificados a placas de 24 pozos, destinándose tres pozos a cada clon. El objetivo de esta amplificación fue el de determinar la productividad específica de los clones, a la vez que incrementar el número de células de cada uno de ellos.

Se permitió que estos cultivos llegasen a confluencia, para luego realizar el subcultivo de las células que crecían en uno de los pozos, amplificándolas a un frasco T de 25 cm² en MCE-AGG al 5% (V/V) SFB. Se realizó el recuento de las células contenidas en el segundo pozo con el fin de determinar la concentración celular en el punto de confluencia y se reemplazó el sobrenadante de cultivo del tercero de los pozos por medio MCE-AGG al 0,1% (V/V) SFB, manteniendo este último cultivo durante 72 h. Al cabo de este tiempo se retiró el medio y se determinó la concentración de rhEPO por ELISA. Los datos de concentración celular y de acumulación de la molécula en el sobrenadante de cultivo se emplearon para el cálculo de la q_{rhEPO} de cada uno de estos clones, bajo estas condiciones de cultivo que simulan un proceso productivo a escala industrial. Estos resultados se muestran en la Tabla VIII.

Una vez que todos los clones se hallaban en cultivo se evaluó su crecimiento, seleccionándose aquéllos que presentaban un alto valor de q_{rhEPO} y una velocidad de crecimiento aceptable (un tiempo de duplicación de aproximadamente 24 h), con vistas a un futuro escalamiento del proceso.

En base a los resultados obtenidos, se decidió continuar con el estudio de los clones B1A2, B1D8, C4B3, C4D8 y C4H8, provenientes de las líneas P2B1 y P2C4, y cuyos valores de productividad oscilaron entre 0,233 y 0,854 % 10^{-6} cél.⁻¹ h⁻¹. Se prosiguió también con el cultivo de los clones B2H5 y B4H5, ya que provenían de otras líneas celulares – las cuales podrían producir un patrón de isoformas de rhEPO diferente, tal vez mejor – y, si bien su productividad específica era sensiblemente menor a la de los otros clones seleccionados, aún resultaría viable a escala industrial.

Todos estos clones fueron amplificados y congelados, preservándolos en nitrógeno líquido.

Tabla VIII: Valores de q_{rhEPO} obtenidos para los clones en estudio.

Línea celular	Clon	q_{rhEPO} (% 10^6 cél. $^{-1}$ h $^{-1}$)
P2B1	B1A2	0,646
	B1A6	0,113
	B1D8	0,233
P2B2	B2D5	0,008
	B2H5	0,067
P2B4	B4A5	0,004
	B4H5	0,067
P2C1	C1G8	0,004
P2C2	C2A5	0,004
P2C3	C3D6	0,046
	C3E6	0,054
P2C4	C4B3	0,758
	C4D8	0,708
	C4H8	0,854
P2C6	C6B12	0,005
	C6H10	0,004
P2D1	D1B6	0,006
P2D2	D2A4	0,007

4.4.4. Caracterización del crecimiento de los clones seleccionados

El desarrollo celular en medios de cultivo de bajo contenido de suero es un prerrequisito para la potencial aplicación industrial de un clon productor. Por ello, una vez demostrado que los clones en estudio se desarrollaban normalmente en el medio de cultivo al 5% (V/V) SFB, se procedió en una primera etapa a adaptar a los clones al crecimiento en un medio de cultivo de menor concentración de suero.

De esta manera los sucesivos subcultivos se realizaron reduciendo progresivamente la concentración de SFB, hasta adaptar los clones B1A2, B1D8, C4B3, C4D8, C4H8, B2H5 y B4H5 al crecimiento en MCE-AGG al 2% (V/V) SFB. Luego de 3 - 4 subcultivos en este medio sin que se verificaran disminución de la velocidad de crecimiento ni alteraciones morfológicas en ninguno de los cultivos, se consideró que la adaptación a este medio con menor contenido de SFB había sido exitosa. Los clones adaptados fueron

congelados y conservados en nitrógeno líquido.

Se procedió entonces a caracterizar el crecimiento de estos clones y determinar sus parámetros metabólicos específicos. A partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento de cada uno de ellos, en MCE-AGG al 2% (V/V) SFB, se preparó una suspensión de concentración 5×10^4 cél. viables ml^{-1} . Esta suspensión se sembró a razón de 2 ml por pozo en placas de 12 pozos. Diariamente se retiró el sobrenadante de cultivo de uno de ellos, el cual fue centrifugado 2 min a 600 g. El sobrenadante libre de células se conservó a -20°C , con el fin de determinar posteriormente la concentración de glucosa, lactato, amonio y rhEPO. Las células adheridas se recuperaron mediante el tratamiento con tripsina, realizándose luego el recuento de células viables y totales.

La Fig. 7 muestra la variación en la concentración de las especies en estudio (células, glucosa, lactato, amonio y rhEPO) con respecto a su valor a tiempo $t=0$ (indicada como $\Delta X_{(t_n)}$) versus el tiempo de cultivo. La variable $\Delta X_{(t_n)}$ se calculó como se indica en la Ec. (19).

Este tipo de gráficos permite obtener información inmediata sobre la cinética de producción (o consumo) de los metabolitos, determinando su evolución día a día del cultivo. Sin embargo, es más apropiado comparar los distintos clones en términos de las velocidades específicas (es decir, por célula y por unidad de tiempo) con que los metabolitos en estudio son generados o utilizados, y esta información no se desprende fácilmente de las gráficas en función del tiempo de cultivo. De ahí la necesidad de representar los datos de manera de obtener a simple vista una comparación más directa entre las velocidades específicas de consumo o producción de cada clon.

La determinación de las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos se llevó a cabo graficando la variación en la concentración de la especie en estudio versus la integral de células viables ($ICV_{(t)}$). Por definición la $ICV_{(t)}$ es una función creciente, tal como puede observarse en la Fig. 8, en la que se encuentra graficada esta variable para cada uno de los clones estudiados en función del tiempo de cultivo:

En general se observaron valores finales de ICV relativamente similares, con excepción de los clones B1D8 y B4H5, lo que era posible anticipar a partir de la Fig. 7.

La representación de $\Delta X_{(t_n)}$ versus la $ICV_{(t)}$ para cada variable en estudio se muestra en la Fig. 9, siendo X la concentración de células viables (Fig. 9a), de glucosa (Fig. 9b), de lactato (Fig. 9c), de amonio (Fig. 9d) y de rhEPO (Fig. 9e).

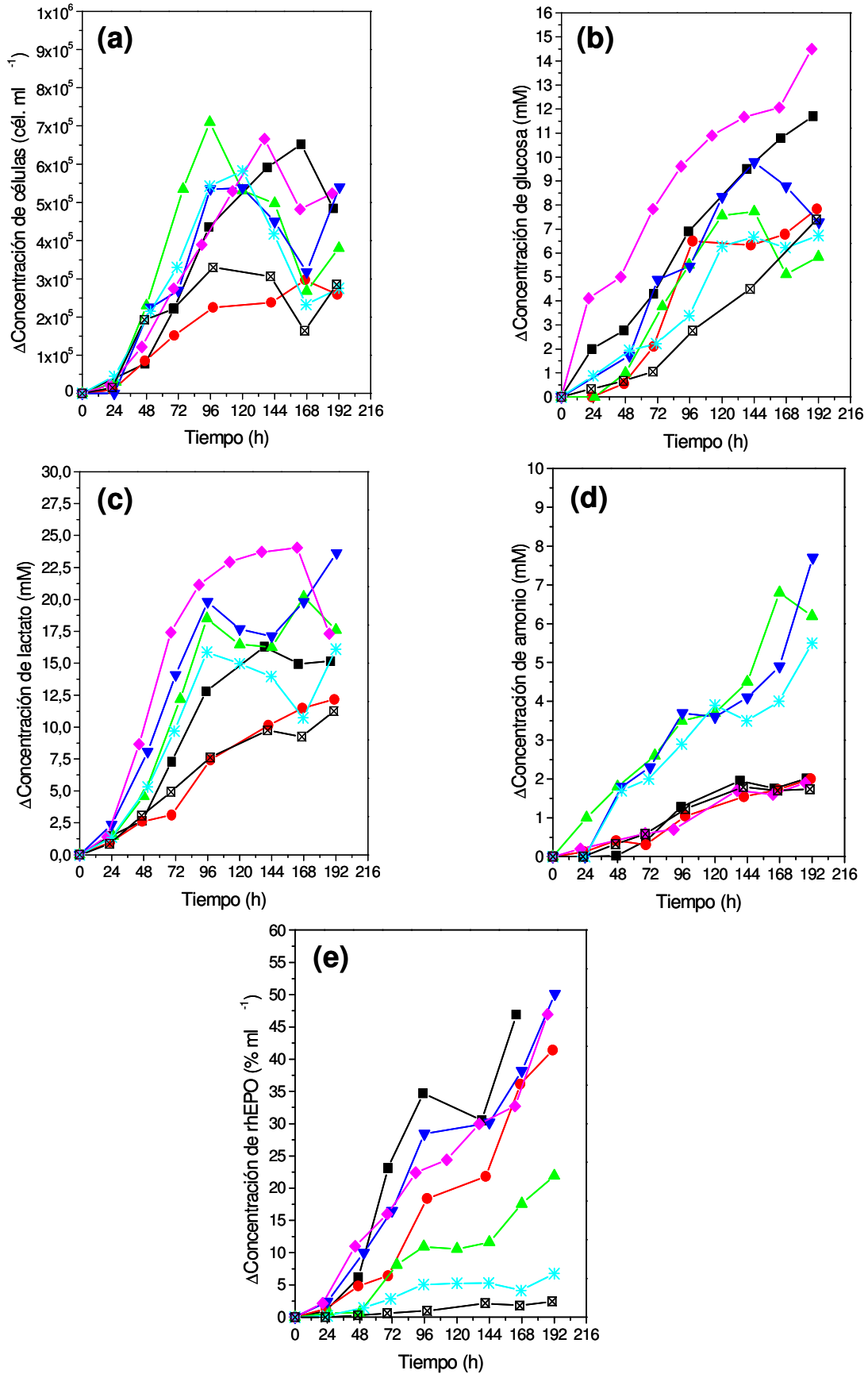


Fig. 7: Curvas de variación en la concentración de (a) células, (b) glucosa, (c) lactato, (d) amonio y (e) rhEPO en función del tiempo de cultivo. (■) clon B1A2, (●) clon B1D8, (▲) clon C4B3, (▼) clon C4D8, (◆) clon C4H8, (✕) clon B2H5, (⊠) clon B4H5.

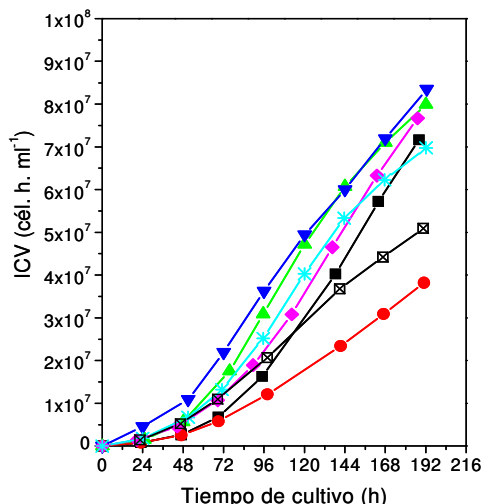


Fig. 8: Curvas de la integral de células viables (ICV) en función del tiempo de cultivo: (■) clon B1A2, (●) clon B1D8, (▲) clon C4B3, (▼) clon C4D8, (◆) clon C4H8, (✱) clon B2H5, (⊠) clon B4H5.

Estos gráficos permiten la comparación directa de las pendientes de las curvas en la zona lineal que corresponde generalmente al inicio de cultivo, siendo el valor de la pendiente de estas rectas igual a la velocidad específica correspondiente. Cuando las curvas dejan de ser lineales las velocidades específicas ya no son constantes, lo que se debe a alteraciones en el metabolismo causadas por el envejecimiento del cultivo y las variaciones que se han producido en el entorno extracelular. En ciertos casos, sin embargo, puede observarse que la velocidad específica se mantuvo constante hasta el final del cultivo, como por ejemplo q_{glc} en el caso del clon B4H5.

La Tabla IX resume los datos de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{am} y q_{rhEPO} obtenidos a partir de los gráficos de la Fig. 9. En la misma tabla se muestran además el valor del coeficiente de regresión del ajuste lineal (R) y su correspondiente valor P .

Las curvas obtenidas son las esperadas para las experiencias que se realizan en placas: si bien se parte de una suspensión celular inicial común y se espera que todos los pozos sembrados evolucionen de manera análoga, se verifica un cierto grado de variabilidad entre ellos. A pesar de las desviaciones inherentes a este tipo de experiencias, los altos valores obtenidos para el coeficiente R en el ajuste realizado sobre las curvas confirma la relación lineal que existe entre la variación en la concentración de las especies en estudio con respecto a la integral de células viables, y son muy significativos si se tiene en cuenta el error asociado a los recuentos celulares (Renard y col., 1988).

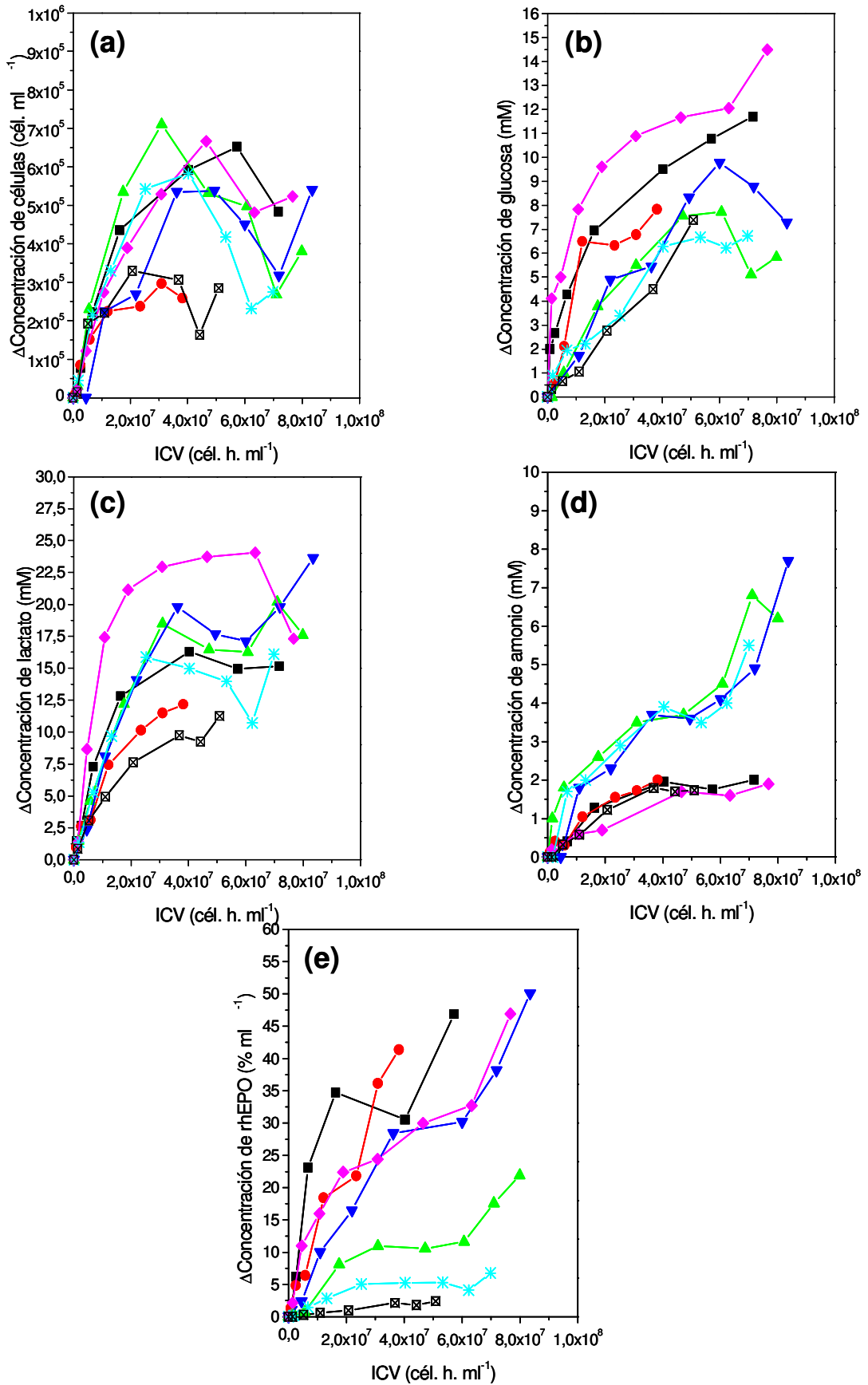


Fig. 9: Curvas de variación en la concentración de (a) células, (b) glucosa, (c) lactato, (d) amonio y (e) rhEPO en función de la ICV. (■) clon B1A2, (●) clon B1D8, (▲) clon C4B3, (▼) clon C4D8, (◆) clon C4H8, (✱) clon B2H5, (⊠) clon B4H5.

Tabla IX: Valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{am} y q_{rhEPO} (\pm SEM) obtenidos para los clones analizados.

Clon	μ (h ⁻¹)	q_{glc} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{lac} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{am} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{rhEPO} (% 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)
B1A2	0,027±0,002 <i>R=0,99</i> <i>P=0,005</i>	540±161 <i>R=0,92</i> <i>P=0,079</i>	773±69 <i>R=0,99</i> <i>P=0,002</i>	82±7 <i>R=0,99</i> <i>P=0,001</i>	3,52±0,32 <i>R=0,99</i> <i>P=0,008</i>
B1D8	0,019±0,003 <i>R=0,97</i> <i>P=0,006</i>	550±53 <i>R=0,99</i> <i>P=0,002</i>	571±61 <i>R=0,98</i> <i>P=0,003</i>	78±15 <i>R=0,95</i> <i>P=0,015</i>	1,46±0,14 <i>R=0,99</i> <i>P=0,002</i>
C4B3	0,031±0,003 <i>R=0,99</i> <i>P=0,009</i>	225±14 <i>R=0,99</i> <i>P=0,004</i>	686±28 <i>R=0,99</i> <i>P=0,002</i>	294±96 <i>R=0,95</i> <i>P=0,202</i>	0,381±0,050 <i>R=0,98</i> <i>P=0,004</i>
C4D8	0,015±0,003 <i>R=0,96</i> <i>P=0,037</i>	223±37 <i>R=0,99</i> <i>P=0,106</i>	659±49 <i>R=0,99</i> <i>P=0,005</i>	117±33 <i>R=0,93</i> <i>P=0,073</i>	0,782±0,081 <i>R=0,99</i> <i>P=0,011</i>
C4H8	0,026±0,001 <i>R=0,99</i> <i>P=0,002</i>	617±205 <i>R=0,90</i> <i>P=0,095</i>	1672±129 <i>R=0,99</i> <i>P=0,006</i>	36±8 <i>R=0,95</i> <i>P=0,049</i>	1,16±0,18 <i>R=0,96</i> <i>P=0,008</i>
B2H5	0,026±0,003 <i>R=0,99</i> <i>P=0,012</i>	273±59 <i>R=0,98</i> <i>P=0,136</i>	737±21 <i>R=0,99</i> <i>P=0,001</i>	169±47 <i>R=0,93</i> <i>P=0,069</i>	0,204±0,007 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>
B4H5	0,022±0,007 <i>R=0,92</i> <i>P=0,082</i>	126±14 <i>R=0,98</i> <i>P=0,003</i>	362±35 <i>R=0,99</i> <i>P=0,003</i>	60±3 <i>R=0,99</i> <i>P=0,0002</i>	0,049±0,003 <i>R=0,99</i> <i>P=0,0005</i>

Se observó un comportamiento similar de los clones B1A2, C4B3, C4D8, C4H8 y B2H5, en términos de densidades celulares máximas alcanzadas. En cambio, para los clones B1D8 y B4H5 las concentraciones celulares máximas alcanzadas fueron inferiores a las de los primeros.

Con respecto a la utilización de la glucosa se verificó una diversidad de perfiles, sin observarse una correlación directa entre la velocidad de consumo de este azúcar o la cantidad consumida hasta el final del cultivo, con la masa celular producida. Mientras que el valor de q_{glc} para el clon B1D8 fue dos veces el valor obtenido para el clon C4B3, este último alcanzó una densidad celular superior al doble de la concentración máxima del primero. Este hecho muestra el grado de variabilidad en la desregulación del consumo de glucosa entre los clones, ya sea que estos provengan de la misma línea celular o de líneas diferentes.

Los clones B1A2, B1D8, C4B3, C4D8 y B2H5 mostraron velocidades específicas de producción de lactato similares entre sí. El valor de q_{lac} extremadamente alto obtenido en el cultivo del clon C4H8, indicó un aprovechamiento muy poco eficiente de la glucosa consumida, observándose la situación contraria en el cultivo del clon B4H5. A pesar de que este último hace un uso más eficiente de la glucosa, esta ventaja no se reflejó en la masa celular obtenida, la cual no es suficiente para considerar la posibilidad de utilizar este clon

en un proceso productivo a mayor escala.

La gran variabilidad observada entre los clones en términos de q_{glc} y q_{lac} se confirma al analizar los valores de rendimiento de lactato a partir de glucosa ($Y_{lac/gluc}$), los que se muestran en la Tabla X. El valor de $Y_{lac/gluc}$ se obtiene al realizar el cociente entre la velocidad específica de producción de lactato y la velocidad específica de consumo de glucosa.

Tabla X: Valores de $Y_{lac/gluc}$ obtenidos para los clones en estudio.

Clon	$Y_{lac/gluc}$
B1A2	1,4±0,5
B1D8	1,0±0,1
C4B3	3,0±0,2
C4D8	2,9±0,5
C4H8	2,7±0,9
B2H5	2,7±0,6
B4H5	2,9±0,4

El rendimiento teórico de lactato obtenido a partir de glucosa en condiciones anaeróbicas tiene un valor máximo de 2 (es decir, se producen a lo sumo dos moles de lactato por mol de glucosa). En la Tabla X, sin embargo, se observan rendimientos superiores a este valor: el excedente de lactato cuantificado sería el resultado de otras vías metabólicas, como la conversión de glutamina a ácido oxalacético y la de éste en piruvato, precursor del lactato.

Una relación $Y_{glc/lac}$ baja indica un mejor aprovechamiento energético de la glucosa, la cual se integraría a otras vías anabólicas, como por ejemplo la vía de las pentosas fosfato o síntesis de ácidos grasos, en lugar de destinarse exclusivamente a la regeneración del NAD^+ como consecuencia del metabolismo desregulado de este azúcar. Los clones provenientes de la línea P2B1 (clones B1A2 y B1D8) fueron los que mostraron un uso más eficiente de la glucosa en este sentido. Sin embargo, las diferencias observadas en la densidad celular obtenida durante el cultivo de estos clones indica que el clon B1A2 no solamente produjo bajos niveles de lactato sino que además realizó un mejor aprovechamiento de los nutrientes presentes en el medio, destinándolos a la producción de masa celular.

Por otra parte, el clon C4H8 fue el que mostró el mayor consumo de la glucosa presente en el medio de cultivo y la mayor acumulación de lactato en el sobrenadante, lo

que se debería a que en la fase del cultivo en que las velocidades específicas ya no son constantes (la relación entre la concentración de la especie y la ICV ya no es lineal), sus valores siguen siendo muy altos. A pesar de este hecho, desfavorable para la perspectiva de un escalamiento del cultivo en modo *batch* por la alta concentración de lactato que se acumularía al final del mismo, la relación entre q_{glc} y q_{lac} es similar a la de los otros clones. Esto, sumado a que el resto de los parámetros (producción de células, amonio y rhEPO) no son superiores a los presentados por los otros clones – indicando así que el clon C4H8 no es metabólicamente más activo que ellos – permitiría suponer que la diferencia en el metabolismo del azúcar sería una mayor desregulación en su ingreso y/o las etapas tempranas de la glicólisis.

Los perfiles de producción de amonio siguieron dos patrones definidos: mientras que una parte de los clones mostró una baja producción de este metabolito, acumulándose alrededor de 2 mM en los sobrenadantes, en el resto de los cultivos se alcanzaron concentraciones entre tres y cuatro veces superiores. Los bajos niveles de amonio observados en los cultivos de los clones B1D8 y B4H5 están relacionados con el limitado desarrollo celular observado en estos. Los clones B1A2 y C4H8, sin embargo, mostraron una baja acumulación de este ion en el sobrenadante, a pesar de haber alcanzado concentraciones celulares superiores al doble de las observadas en los cultivos de los clones B1D8 y B4H5. En todos estos casos la concentración de amonio se mantuvo relativamente constante hasta el final del cultivo.

Contrariamente, la velocidad de producción de amonio para los clones C4B3, C4D8 y B2H5, aunque disminuyó luego de las primeras 72 horas de cultivo, se mantuvo en valores elevados, haciendo que la concentración de este catabolito se incrementara en forma continua hasta el último día de cultivo.

Un comportamiento muy diferente se verificó en cuanto a la producción de rhEPO, según puede observarse en la Fig. 9. Las velocidades de producción de los clones B1A2, B1D8 y C4H8 fueron superiores en un orden de magnitud con respecto al resto de los clones, acumulándose concentraciones similares de proteína recombinante en el sobrenadante de cultivo. Resulta llamativa la productividad presentada por el clon B1D8, probablemente basada en un mayor número de copias del plásmido con el gen de rhEPO. El resultado de la selección de un clon productor se sustenta, como ya se ha especificado, en un conjunto de variables, entre las que la velocidad específica de producción de rhEPO es una de ellas.

Se ha mencionado anteriormente que la velocidad de producción (o consumo) de una determinada especie es constante bajo un determinado conjunto de condiciones

(Renard y col., 1988), y ésta es la razón por la cual los valores de q_{rhEPO} citados en las Tablas VIII y IX difieren entre sí: mientras que los primeros se obtuvieron a partir de un cultivo celular en monocapa confluyente, en MCE-AGG al 0,1% (V/V) SFB y en un único punto (72 h a partir del recambio de sobrenadante), los segundos se calcularon a partir de un cultivo en crecimiento exponencial en MCE-AGG al 2% (V/V) SFB como pendientes de la recta ajustada sobre los datos de varios días de cultivo.

4.4.5. Caracterización del perfil de isoformas de rhEPO producidas por los clones seleccionados

Luego del análisis del crecimiento y metabolismo de los clones se procedió a caracterizar la molécula de rhEPO producida, mediante la separación de las diferentes isoformas por electroforesis en un gel de poliacrilamida en gradiente de pH o isoelectroenfocado. Las proteínas fueron posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante la acción de un campo eléctrico y reveladas por una reacción inmunoquímica, de acuerdo con la técnica descrita en Materiales y Métodos.

El estudio del perfil de isoformas producidas se realizó de manera cualitativa, dado que en el momento de realizar estas experiencias no se disponía aún del *scanner* UMAX y el *software* ImageToolLab (GE Healthcare, EE.UU.), empleados posteriormente para realizar la densitometría de las bandas obtenidas en el ensayo de isoelectroenfocado y así determinar la proporción relativa de las glicofomas.

En la Fig. 10 se presenta el análisis de los sobrenadantes de cultivo de los diferentes clones. Pudo observarse la desaparición de una y hasta dos isoformas de mayor contenido de ácido siálico en las muestras correspondientes a los clones B2H5, C4B3 y C4D8 con respecto al resto de los clones, lo que constituye una desventaja desde el punto de vista de su explotación a escala industrial, ya que se busca producir preferentemente estas isoformas.

Por otra parte, el patrón de isoformas producidas por los clones B4H5 y B1D8 presenta un menor contenido de isoformas de alto punto isoeléctrico que el de los clones B1A2 y C4H8, lo cual en principio sería un hecho favorable. Sin embargo, la productividad del clon B4H5 – en términos de q_{rhEPO} y de la concentración de esta proteína acumulada en el sobrenadante durante el cultivo – es muy inferior a la observada para los clones B1A2 y C4H8. En forma análoga, y desde el punto de vista de su crecimiento, el clon B1D8 sólo pudo alcanzar al final del cultivo una densidad celular de aproximadamente el 50% del máximo logrado por los clones B1A2 y C4H8, y su velocidad específica de crecimiento fue muy baja, superando sólo a la del clon C4D8 (ver Tabla IX).

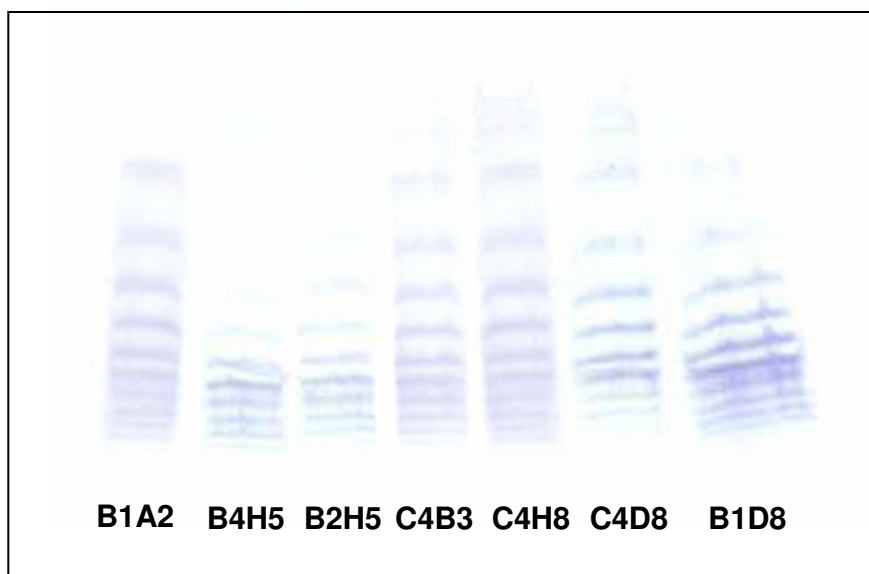


Fig. 10: Perfil de isoformas de rhEPO producidas por los clones en estudio, analizadas por IEF seguido de *Western blot*.

Dado que los objetivos planteados al comenzar esta etapa eran el obtener clones recombinantes productores de hEPO y seleccionar aquéllos que en mayor medida respondieran a las expectativas en cuanto al patrón de glicofomas producidas, su crecimiento y productividad, se decidió continuar el proceso de adaptación al crecimiento en suspensión con los clones B1A2 y C4H8. Ambos clones presentaron un perfil de glicosilación con alto contenido de isoformas acídicas y una alta velocidad específica de producción de rhEPO durante todo el cultivo, lo que permitió alcanzar una concentración final elevada de esta proteína. De igual manera, los cultivos evolucionaron logrando densidades celulares similares al resto de los clones mostrando una velocidad de crecimiento apropiada previendo el posterior escalamiento del proceso. Finalmente, desde el punto de vista energético, estos clones mostraron una baja velocidad de producción de amonio y una buena relación $Y_{lac/glc}$, particularmente el clon B1A2. Si bien se produce una alta acumulación de lactato en el sobrenadante de cultivo del clon C4H8, las concentraciones alcanzadas se encuentran dentro del rango reportado para células CHO (Ozturk y col., 1997).

Antes de continuar con la adaptación de los clones B1A2 y C4H8 al crecimiento en suspensión, tanto en un medio adicionado con SFB como en un medio libre de proteínas, se llevaron a cabo una serie de experiencias tendientes a optimizar el medio de cultivo MCE-AGG, empleado para las experiencias descritas anteriormente.

A raíz de observaciones previas realizadas durante el proceso de producción de esta proteína en nuestro laboratorio, se decidió estudiar el comportamiento del clon utilizado en este proceso (denominado clon P3B4) en el medio MCE, con menor contenido de glucosa y glutamina con respecto al medio MCE-AGG. Una menor concentración de estas especies, además de simplificar el proceso de preparación de medio de cultivo y disminuir el costo del mismo, podría redundar en una menor acumulación de lactato y amonio en el sobrenadante de cultivo (Glacken, 1988).

4.4.6. Estudio comparativo entre los medios MCE-AGG y MCE, utilizando un sistema símil perfusión

A partir de un cultivo en suspensión del clon P3B4 en frascos *spinner* en MCE-AGG al 0,2% (V/V) SFB, el cual se encontraba en fase de crecimiento exponencial, se tomaron dos alícuotas, las que fueron centrifugadas durante 8 min a 200 *g*. El *pellet* celular obtenido a partir de cada alícuota se resuspendió en 200 ml del medio correspondiente, ambos adicionados de 0,2% SFB.

Diariamente se tomó una muestra de ambos cultivos en estudio con el fin de realizar el recuento de células viables y no viables. Estas muestras fueron posteriormente centrifugadas 2 min a 600 *g* y el sobrenadante de cultivo se conservó a -20°C hasta el momento de la determinación de los metabolitos de interés.

Aproximadamente a las 96 h los cultivos alcanzaron una alta concentración de células ($>7,5 \times 10^5$ cél viables ml^{-1}), iniciándose en ese momento una modalidad de recambio parcial del sobrenadante de cultivo en forma diaria. Este recambio por pulsos se realizó con la intención de aportar nuevos nutrientes y disminuir la concentración de catabolitos tóxicos en el entorno celular, con un efecto similar al que se verifica en un proceso de perfusión.

El proceso de recambio consistía en tomar una primera muestra – y proceder con ella tal como se describió anteriormente – para luego centrifugar la mitad del volumen de la suspensión celular (8 min a 200 *g*) y resuspender el *pellet* en el mismo volumen de medio fresco, regresando esta suspensión al frasco *spinner* correspondiente. Una vez homogeneizado el cultivo, se tomaba nuevamente una muestra, se determinaba la concentración de células con el fin de verificar que ni la densidad celular inicial ni la viabilidad se hubieran visto afectadas por este procedimiento, y se conservaba el sobrenadante a -20°C para la determinación de metabolitos.

Considerando las altas densidades celulares alcanzadas, se decidió reducir el volumen de trabajo a 100 ml de suspensión (día 16 de cultivo) para incrementar la relación superficie/volumen y favorecer así la oxigenación del cultivo. La modalidad de sustituciones

parciales del sobrenadante se continuó llevando a cabo como se describió previamente.

A partir del día 23 se redujo el contenido de SFB de los medios de cultivo empleados para los recambios a una concentración de 0,1% (V/V). De esta manera se igualaron las condiciones de producción de rhEPO a las que se utilizan en los cultivos de alta densidad a escala industrial.

En la Fig. 11 se muestran las gráficas correspondientes a la concentración de células viables y totales en función del tiempo de cultivo para ambos cultivos. Se observó que luego de una fase de crecimiento exponencial inicial, la que se extendió hasta las 72 h aproximadamente, la velocidad de crecimiento disminuyó, manteniéndose hasta el día 11 para el cultivo en medio MCE-AGG al 0,2% SFB y hasta el día 13 para el cultivo en MCE al 0,2% (V/V) SFB. En ese punto además es cuando ambos cultivos alcanzan sus densidades celulares máximas, $2,6 \times 10^6$ cél. viables ml^{-1} y $3,2 \times 10^6$ cél. viables ml^{-1} , respectivamente. En los días posteriores la concentración de células disminuyó ligeramente, para finalmente estabilizarse al final de los cultivos, consiguiendo mantenerse densidades celulares constantes en el tiempo debido a la reposición de nutrientes y la remoción de metabolitos tóxicos como consecuencia del reemplazo del medio de cultivo. En la figura se indican además los momentos en los cuales se realizaron cambios en las condiciones de trabajo.

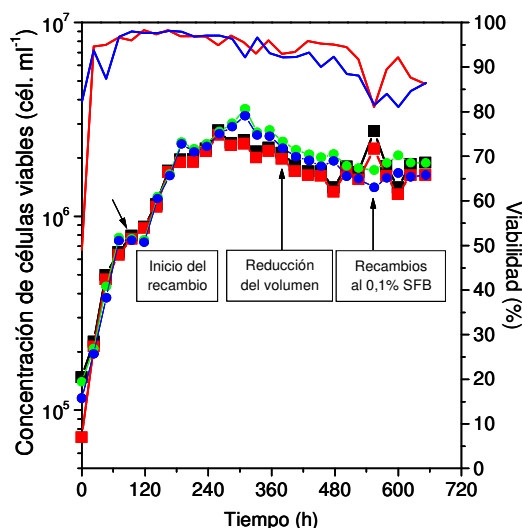


Fig. 11: Curvas de concentración de células para los cultivos del clon P3B4 en suspensión en medios MCE AGG y MCE, ambos al 0,2% (V/V) SFB: (■) células totales en MCE-AGG, (■) células viables en MCE-AGG, (●) células totales en MCE, (●) células viables en MCE, (→) viabilidad en MCE-AGG, (→) viabilidad en MCE.

Puede observarse en la Fig. 12 que las curvas de ICV en función del tiempo presentan una forma muy similar, si bien a partir del día 8 de cultivo dejan de superponerse, siendo el valor máximo de ICV alcanzado por el cultivo en MCE-AGG ($1,03 \times 10^9$ cél. h ml⁻¹) levemente inferior al del cultivo en MCE ($1,13 \times 10^9$ cél. h ml⁻¹).

Cuando se grafican la variación en la concentración de células viables en función de la ICV con el fin de obtener la velocidad específica de crecimiento se observa, en ambos casos, un comportamiento variable durante el transcurso del cultivo. Es posible entonces diferenciar cuatro zonas, las que se indican como A, B, C y D, cuyos valores de μ varían significativamente. Para una mejor comprensión de los datos, la gráfica de puntos fue ajustada con el programa Microcal[®] Origin[®] v. 5.0 (Microcal Software, EE.UU.), trazando una curva que considera el promedio de cinco puntos adyacentes.

La primera zona corresponde a un crecimiento exponencial del cultivo y se extiende hasta los primeros 7-8 días. A esta zona corresponde el valor de μ más alto para cada cultivo, los que son prácticamente iguales en ambos casos. Sigue a ésta otra región en la que el crecimiento celular es más lento, y los valores de μ disminuyen a un 25%-30% del calculado para la zona A. Una vez que se alcanza la máxima concentración celular en los dos casos se distingue un cambio drástico en el perfil de crecimiento por el cual los valores de μ se hacen negativos. Este hecho indica que la velocidad específica de muerte (k_d) es superior a la velocidad de crecimiento real μ_r , y, en consecuencia, la concentración de células viables disminuye, manteniéndose esta situación durante 8-10 días. Al cabo de este tiempo los cultivos entran en una fase de estabilización del crecimiento, en la cual la densidad celular se mantiene casi constante y en un valor cercano al 50% de la concentración máxima de células. En esta fase k_d es aproximadamente igual a μ_r y debido a esto no se observa variación en la cantidad de células por unidad de volumen. Los datos de μ obtenidos para cada zona en los dos cultivos se presentan en la Tabla XI.

Tabla XI: Valores de μ obtenidos para las distintas zonas identificadas en las curvas de crecimiento del clon P3B4 cultivado en frascos *spinner* en MCE-AGG y MCE, ambos al 0,2% (V/V) SFB.

Medio de cultivo	μ (h ⁻¹)			
	Zona A	Zona B	Zona C ^a	Zona D ^b
MCE-AGG	0,012±0,001 R=0,98 P<0,0001	0,0045±0,0009 R=0,95 P=0,013	-0,0026±0,0004 R=0,95 P=0,0003	$\mu \approx 0$
MCE	0,0127±0,0009 R=0,98 P<0,0001	0,0046±0,0003 R=0,99 P=0,0004	-0,0033±0,0004 R=0,96 P<0,0001	$\mu \approx 0$

^a El signo negativo indica que la concentración de células disminuye en lugar de aumentar $\mu_r \ll k_d$.

^b En esta región se considera $\mu \approx 0$ ya que $\mu_r \approx k_d$ y, en consecuencia, la concentración de células se mantiene relativamente constante.

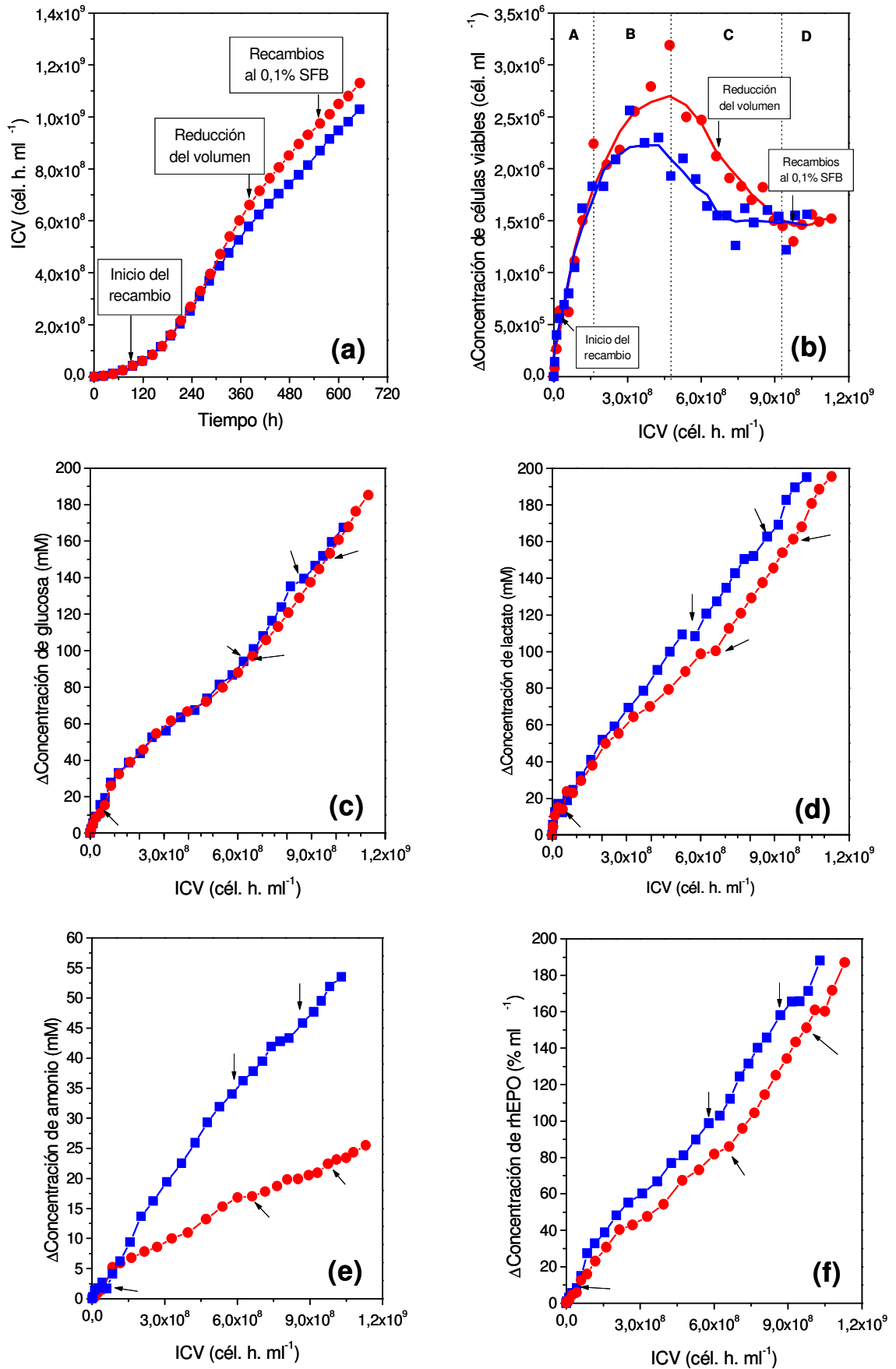


Fig. 12: Curvas de (a) ICV y curvas de variación en la concentración de (b) células, (c) glucosa, (d) lactato, (e) amonio y (f) rhEPO en función de la ICV. (■) MCE-AGG (●) MCE

Con el fin de calcular las velocidades específicas q_{glc} , q_{lac} , q_{am} y q_{rhEPO} en primer lugar se calculó la variación en la concentración de estos metabolitos, de forma acumulada, considerando el volumen de sobrenadante retirado diariamente (con el remanente de cada especie) y la cantidad de glucosa, lactato y amonio presente en el medio de cultivo fresco empleado para hacer el recambio. Una vez graficados estos datos en función de la ICV (Fig. 12) se concluye que no existen diferencias significativas en el comportamiento de ambos cultivos, excepto en la producción de amonio, ya que el cultivo en MCE produce una menor cantidad de este catabolito, posiblemente debido al menor contenido de glutamina. Los valores de velocidad específica calculados para el cultivo en toda su extensión, es decir, considerando todas las zonas, se resumen en la Tabla XII.

Tabla XII: Parámetros metabólicos específicos del clon P3B4 cultivado en frascos *spinner* en los medios MCE-AGG y MCE, ambos al 0,2% (V/V) SFB.

Medio de cultivo	q_{glc} (nmol 10^6 cél $^{-1}$ h $^{-1}$)	q_{lac} (nmol 10^6 cél $^{-1}$ h $^{-1}$)	q_{am} (nmol 10^6 cél $^{-1}$ h $^{-1}$)	q_{rhEPO} (% 10^6 cél $^{-1}$ h $^{-1}$)
MCE-AGG	839±15 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	998±22 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	52±1 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	0,173±0,003 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
MCE	830±17 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	872±32 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	21±1 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	0,151±0,003 <i>R=0,99 P<0,0001</i>

La eficiencia energética en términos de rendimiento de glucosa en lactato fue similar para ambos cultivos, siendo $Y_{\text{lac}/\text{glc}}=1,19\pm0,03$ para el medio MCE-AGG e $Y_{\text{lac}/\text{glc}}=1,05\pm0,04$, para el medio MCE.

Dado que los parámetros de ajuste R y P confirman que las velocidades específicas se mantuvieron constantes a lo largo de toda la experiencia, puede concluirse que ninguna de las modificaciones a la metodología de cultivo – ya sea la reducción del volumen de trabajo con el consecuente incremento en la oxigenación como la reducción en el contenido de SFB en la etapa final del cultivo – tuvieron algún efecto marcado sobre el metabolismo celular. De igual manera, el sistema de recambios parciales del medio de cultivo permite mantener altas densidades celulares que producen rhEPO a la velocidad específica máxima alcanzada en la fase de crecimiento exponencial.

Se procedió entonces a caracterizar el perfil de glicosilación de la molécula de rhEPO obtenida en ambos medios de cultivo, mediante isoelectroenfocado seguido de *Western blot*, el cual se muestra en la Fig. 13.

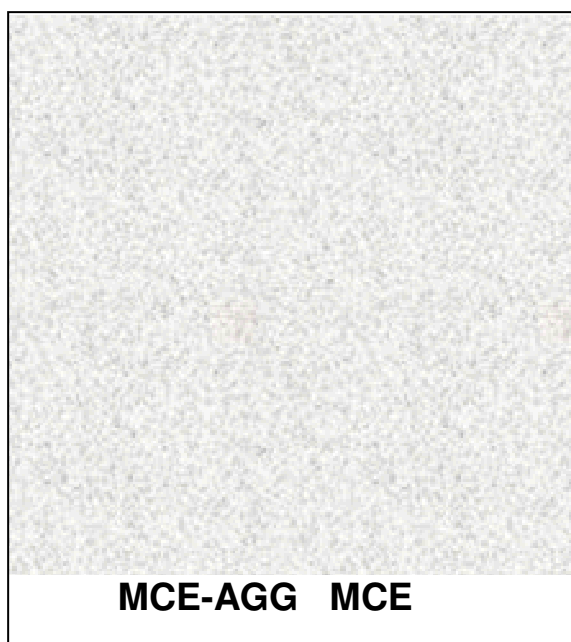


Fig. 13: Perfil de isoformas de rhEPO producidas por el clon P3B4 cultivado en suspensión en medios MCE-AGG y MCE, ambos al 0,2% (V/V) SFB.

Así como se había observado hasta el momento, en ambos cultivos se obtiene un patrón de isoformas análogo, si bien la muestra correspondiente al cultivo en MCE pareciera tener una menor proporción de glicofomas menos acídicas. Esta mejora en el perfil de glicosilación se debe probablemente a la menor concentración de amonio en el medio de cultivo, tal como fue posible comprobar más adelante en este trabajo.

Tomando en consideración que la mayoría de los parámetros metabólicos no presentan diferencias entre los cultivos en uno u otro medio, y dado que en MCE se acumulan concentraciones menores de amonio, lo que a su vez redundaba en un incremento en el contenido de isoformas ácidas de rhEPO (como se verá en el capítulo siguiente), se decidió emplear este medio de cultivo en lugar del MCE-AGG. Consecuentemente, los clones B1A2 y C4H8 seleccionados previamente también se adaptaron al crecimiento en suspensión en este nuevo medio de cultivo.

4.4.7. Adaptación al crecimiento en suspensión de los clones B1A2 y C4H8 en los medios MCE y SMIF 6

El proceso de adaptación a suspensión de los clones B1A2 y C4H8 tanto en medio de cultivo MCE con bajo contenido de SFB como en el medio de cultivo libre de proteínas SMIF 6 se realizó mediante una modificación del protocolo de adaptación progresiva propuesto por Scharfenberg y Wagner (1995).

A continuación se describe el proceso llevado a cabo para los dos clones en ambos medios de cultivo, y los resultados obtenidos en cada caso.

4.4.7.1. Protocolo de adaptación progresiva de Scharfenberg y Wagner

El proceso de adaptación a suspensión propuesto originalmente por Scharfenberg y Wagner permitió adaptar células CHO y BHK recombinantes que crecían en adherencia en una mezcla 1:1 de medios IMDM:HAM's F12 al 5% (V/V) SFB a crecer en suspensión en el medio libre de proteínas SMIF 6, mediante recambios parciales sucesivos del medio de cultivo.

Las células se cultivaron en adherencia en frascos T de 175 cm² hasta alcanzar un estado de superconfluencia. La adaptación al medio libre de proteínas se inició a partir de una reducción progresiva del contenido de SFB mediante la sustitución del 4/5 partes del sobrenadante de cultivo por igual volumen de medio SMIF 6, de acuerdo con la Fig. 14.

El procedimiento de sustitución parcial del sobrenadante de cultivo por medio fresco se repitió sucesivamente por un período de dos a tres semanas (Fig. 14, ciclo de la izquierda), y durante este proceso las células perdieron parte de su capacidad de adhesión al sustrato, formando agregados celulares de tamaño variable que se desprendían y pasaban al sobrenadante. La frecuencia con que los recambios de medio eran realizados se estableció en base a la determinación de la concentración de glucosa de los cultivos, ya que ésta no debía ser inferior a 0,7-1,0 g l⁻¹. Igualmente, si habían transcurrido ya siete días desde el último recambio del medio y aunque la concentración de glucosa se mantuviera por encima de estos valores, se procedía a realizar la sustitución del sobrenadante.

Los agregados celulares que no se encontraban adheridos a la superficie del frasco de cultivo fueron cosechados y transferidos a frascos *spinner* de 50 ml de volumen de trabajo. A lo largo de los siguientes subcultivos la velocidad de agitación se incrementó de 20 rpm a 50 rpm, con el objeto de desintegrar estos grupos de células. Dado que la velocidad de sedimentación de los agregados varía en función de su tamaño, solamente células individuales y pequeños grupos fueron cosechados para el siguiente subcultivo. Luego de un período de 4 a 9 semanas los autores consideraron finalizado el proceso de adaptación de las células, las cuales crecían ya no como agregados sino en forma individual, y presentaban características de crecimiento comparables a aquéllas que crecían en cultivos en presencia de SFB (tiempo de duplicación promedio de 48 h), sin verificarse disminución de su productividad.

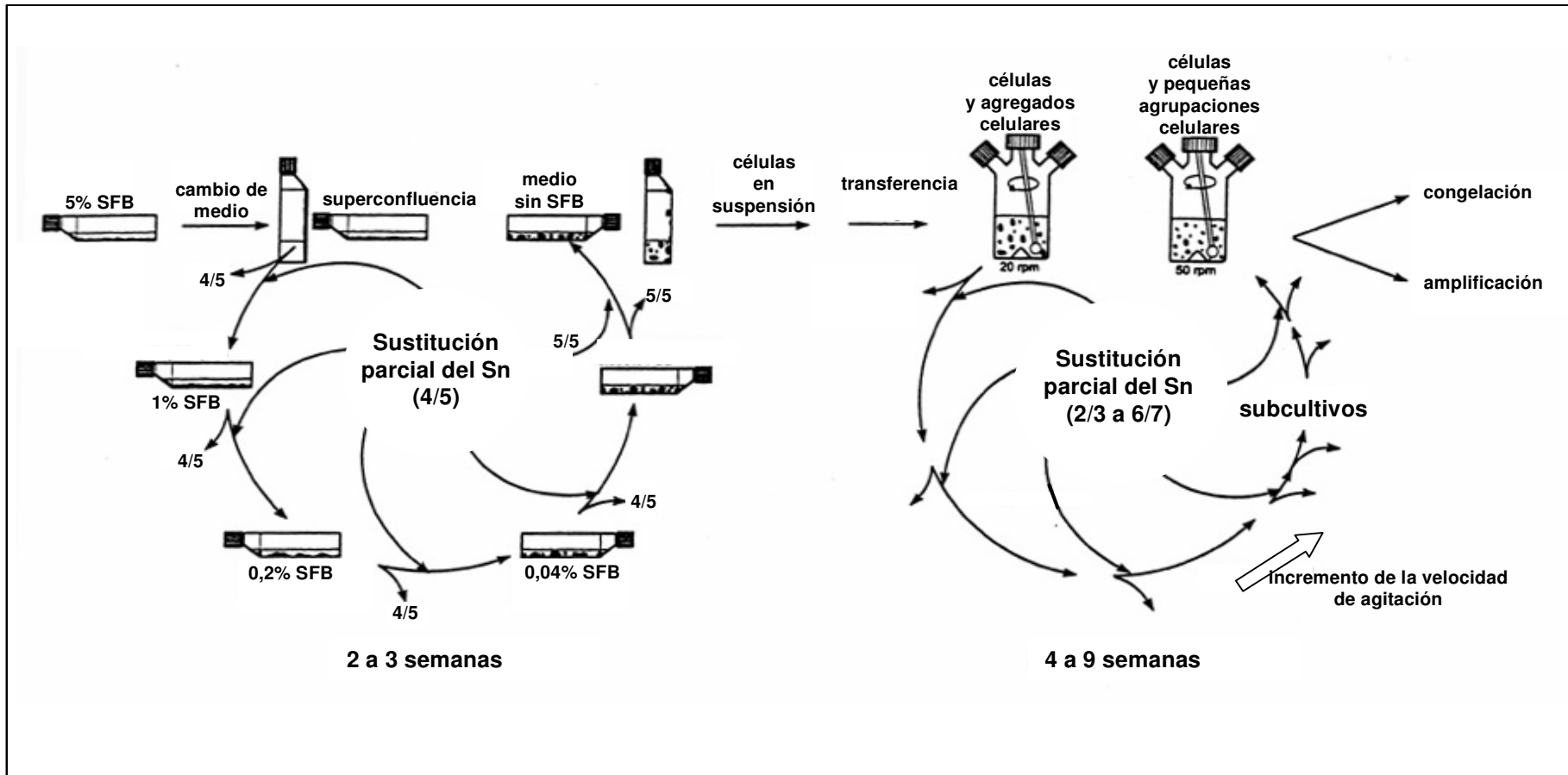


Fig. 14: Esquema del proceso de adaptación al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6 propuesto por Scharfenberg y Wagner (1995).

4.4.7.2. Adaptación progresiva del clon B1A2 al crecimiento en suspensión en medio MCE

Se partió de cultivos del clon B1A2 en medio MCE al 2% (V/V) SFB, los cuales crecían en adherencia en frascos T de 75 cm² de superficie. Estos cultivos fueron subcultivados en medio MCE reduciendo la concentración de suero a 1% (V/V). Posteriormente, parte de estas células fueron congeladas en nitrógeno líquido, mientras que se permitió que el resto creciera hasta alcanzar el estado de monocapa superconfluyente, iniciándose en ese momento el proceso de adaptación progresiva al crecimiento en suspensión de acuerdo con el protocolo propuesto por Scharfenberg y Wagner. Aquellas células que permanecieron adheridas al sustrato en medio con un contenido reducido y/o sin suero también fueron preservadas.

El clon fue adaptado a crecer en suspensión en MCE adicionado de diferentes cantidades de SFB, determinándose la concentración mínima de éste que debe adicionarse al medio para obtener una velocidad de crecimiento aceptable desde un punto de vista productivo.

La adaptación del clon B1A2 se inició con la sustitución parcial del sobrenadante de cultivos en frascos T, utilizándose MCE sin SFB para los recambios de medio (excepcionalmente se empleó MCE con SFB, según se indica más adelante). En aquellos casos en los que se menciona el uso de medio de cultivo *condicionado* se trata del sobrenadante retirado, el cual se centrifugó para separar las células y se incorporó al cultivo para aportar factores de crecimiento secretados por las propias células, en la proporción indicada.

El cultivo en frasco *spinner* se inició a partir del sobrenadante retirado de los cultivos en adherencia, los cuales fueron centrifugados y el *pellet* celular resuspendido en 50 ml, empleándose MCE en los sucesivos recambios. Al realizar subcultivos de esta suspensión se dejaron sedimentar los agregados celulares más grandes, con el fin de favorecer la selección de aquellas células que se encontraban creciendo en forma individual en suspensión. La velocidad de agitación se incrementó progresivamente de 20 rpm a 50 rpm, para disminuir gradualmente el tamaño de los agregados celulares.

Durante el proceso de adaptación se monitoreó la formación y desintegración de estos agregados, estableciendo la evolución de sus dimensiones. Al inicio de la adaptación, el tamaño normal promedio de los agregados de células del clon B1A2 en medio MCE al 2% (V/V) SFB era de aproximadamente 10 µm de diámetro por 100-125 µm de largo, en forma de huso. Las células adoptaron forma esférica con un diámetro aproximado de 20-25 µm cuando fueron adaptadas al crecimiento en suspensión.

En las Tablas XIII y XIV se resume el proceso de adaptación llevado a cabo para el clon B1A2 en el medio MCE, describiéndose los eventos más sobresalientes.

Tabla XIII: Adaptación del clon B1A2 al crecimiento en adherencia en el medio MCE reducido en SFB.

ADHERENCIA		
Tiempo (días)	Observaciones	Conc. final de SFB
0	Se inicia el cultivo a alta densidad en frascos T 75 cm ²	1,0000%
3	Monocapa superconfluente. Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE	0,2000%
5	Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE	0,0400%
7	Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE	0,0080%
10	Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE	0,0016%
13	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
17	Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE	0,0000%
20	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
24	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
29	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
35	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
41	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
48	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
55	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
63	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
69	Se congeló 1 criotubo	0,0000%

El criterio adoptado para considerar que un conjunto de células ha sido adaptado a determinadas condiciones de cultivo es el de verificar que éstas son capaces de replicarse en dichas condiciones, luego de realizar sucesivos subcultivos. En los casos de cultivos en suspensión se requerirá también que las células crezcan preferentemente en forma individual, aceptando una proporción pequeña de agregados formados por no más de diez células. Debe notarse que crecimiento y mantenimiento de la viabilidad son dos eventos diferentes: si bien bajo ciertas condiciones extremas las células son capaces de sobrevivir, destinando toda su energía a mantener su metabolismo basal, estas condiciones pueden ser insuficientes para soportar la replicación celular.

Con el fin de definir la concentración mínima de SFB que debe ser adicionada al MCE para permitir un crecimiento celular suficiente en términos de velocidad de crecimiento, viabilidad y concentración máxima de células alcanzada - es decir, que el SFB no se

comporte como limitante cinético o estequiométrico del crecimiento - a los 0, 3, 5, 7 y 10 días se tomó una alícuota de las suspensiones, las que fueron subcultivadas en MCE adicionado de la concentración correspondiente de SFB (1%, 0,2%, 0,04%, 0,008% y 0,0016% V/V, respectivamente). La viabilidad del cultivo se estimó por el número de células que permanecían adheridas al sustrato y se mostraban refringentes, con morfología normal, sin vacuolas, con un citoplasma homogéneo y un tamaño regular.

De esta forma fue posible determinar que la menor concentración de SFB requerida para mantener una velocidad de crecimiento y una densidad celular aceptables fue de 0,2%. Si bien las células lograron mantenerse viables con concentraciones menores y aún en ausencia de SFB, la velocidad de crecimiento se vio drásticamente reducida en todos los casos, haciendo inviable el uso de estas condiciones.

Parte de las células en MCE al 0,2% (V/V) SFB fueron entonces subcultivadas en MCE al 0,1% (V/V) SFB, observándose que la viabilidad se mantenía en valores elevados, aunque el crecimiento (en un cultivo no confluyente) era bastante menor. De esta forma se consideró que la concentración crítica de SFB como limitante cinético – con el fin de un uso productivo posterior – es 0,2%, mientras que una concentración igual a la mitad permite mantener una alta viabilidad durante un tiempo suficiente, lo cual resulta de gran utilidad cuando no se requiere que el cultivo se multiplique. Ejemplos de este último caso son la determinación de la productividad celular y la producción de la proteína en cultivos de muy alta densidad celular como los cultivos en perfusión.

A partir del día 5, las células viables que se encontraban en el sobrenadante de los frascos T se cosecharon con el fin de iniciar el cultivo en suspensión de las mismas. Estas células fueron entonces cosechadas y centrifugadas 8 min a 200 g, para luego resuspenderlas en una mezcla de medio condicionado y MCE fresco. Una estrategia aplicada frecuentemente fue la de retirar las células del sobrenadante de los cultivos en adherencia, centrifugarlas y agregarlas al frasco *spinner*, con el objeto de incrementar la concentración celular en los mismos.

El proceso de adaptación a suspensión se resume en la Tabla XIV. Debido a la baja densidad celular inicial de estos cultivos en suspensión, no fue posible repetir el procedimiento descrito anteriormente de realizar subcultivos en distintas concentraciones de SFB para determinar la concentración mínima de suero requerida. Solamente el día 10 se separó una pequeña alícuota de la suspensión, la cual fue centrifugada y el *pellet* resuspendido en MCE al 0,2% (V/V) SFB, basándose esta decisión en la observación de que el cultivo en adherencia mantenía un crecimiento normal en esa concentración de SFB.

Tabla XIV: Adaptación del clon B1A2 al crecimiento en suspensión en el medio MCE reducido en SFB.

SUSPENSIÓN		
Tiempo (días)	Observaciones	Conc. final de SFB
5	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> celular se resuspende en una mezcla 1:4 de medio condicionado:MCE	0,0400%
7	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se agrega al <i>spinner</i>	0,0400%
10	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> celular se agrega al <i>spinner</i> . La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en una mezcla 1:4 de medio condicionado:MCE	0,0080%
16	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> celular en una mezcla 1:4 de medio condicionado:MCE	0,0016%
17	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se agrega al <i>spinner</i>	0,0016%
20	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se agrega al <i>spinner</i>	0,0016%
23	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE al 0,0020%SFB	0,0020%
24	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se agrega al <i>spinner</i>	0,0020%
29	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> celular se agrega al <i>spinner</i> . La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
33	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con MCE	0,0000%
36	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
43	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
46	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
48	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
50	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
51	Se hace una dilución 2/3 de la suspensión con MCE	0,0000%
53	Se hace una dilución 1/2 de la suspensión con MCE	0,0000%
55	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
57	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
58	Se hace una dilución 2/3 de la suspensión con MCE	0,0000%
61	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
64	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
68	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
69	Se congelaron 2 criotubos	0,0000%

Las células así cultivadas requirieron de un período de adaptación de aproximadamente una semana, y luego iniciaron un crecimiento sostenido en este medio, alcanzando una concentración máxima de $1,05 \times 10^6$ cél. viables ml^{-1} . Cuando este clon se cultivó en MCE al 0,1% (V/V) SFB disminuyó la velocidad de crecimiento, en forma similar a lo observado en el cultivo en adherencia. Esto indicaría, en principio, que el SFB se comportaría como un limitante cinético del crecimiento de estas células en particular,

aunque una afirmación categórica al respecto sólo podría realizarse luego de un estudio más exhaustivo, debido a que en ciertos casos se observa una reversión parcial de este fenómeno luego de varios subcultivos.

Por otro lado, este clon no pudo ser adaptado a suspensión en medio MCE sin SFB, ya que a pesar de que se verificó replicación celular el cultivo no superó la concentración de $1,2 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1} .

En la Fig. 15 se presenta la evolución del proceso de adaptación a suspensión descrito anteriormente. Durante la reducción del SFB en el cultivo del clon B1A2 pudo observarse cómo la monocapa inicial se retrajo progresivamente, y mientras parte de las células perdieron su adhesión al sustrato, desprendiéndose del mismo para pasar al sobrenadante, aquellas que permanecían adheridas mostraron cambios en su morfología, incrementando la relación longitud/diámetro y agrupándose en forma de estrella alrededor de un núcleo esférico constituido por un gran número de células desprendidas del frasco de cultivo, pero adheridas entre sí. Estos grandes cúmulos de células – de hasta $600 \mu\text{m}$ de diámetro – gradualmente fueron desprendiéndose y pasando al sobrenadante, dejando a la vista las formaciones estrelladas. El cambio en la morfología y la detención del crecimiento celular fueron indicadores del estado de estrés metabólico provocado por la baja concentración de SFB – ya que los sucesivos recambios con medio de cultivo fresco garantizan un aporte suficiente del resto de los nutrientes –, y comenzaron a observarse cuando la concentración de suero fue de 0,04% (V/V). Debido a que las células que crecen en adherencia deben desprenderse del frasco de cultivo en el momento de la división celular, es posible que la ausencia de factores de adhesión aportados por el SFB les impidiera volver a adherirse una vez completado este proceso, lo que sugeriría que las células que se mantuvieron adheridas se encontraban arrestadas en la fase G1 del ciclo celular. La formación de focos de células podría ser una respuesta frente a un entorno agresivo, para mantener la adhesión entre las células aún en ausencia de los factores específicos aportados por el SFB.

Aquellas células que continuaban viables en MCE sin agregado de SFB fueron preservadas por congelación, dado que podrían luego ser utilizadas para el estudio de nuevos suplementos para sustituir al suero animal. Sin embargo, y dado que este trabajo de tesis se restringe a la mejora del proceso productivo de rhEPO – el cual se realiza con células en suspensión en un biorreactor tipo tanque agitado con perfusión – se continuarán los estudios empleando el clon B1A2 adaptado al crecimiento en suspensión en MCE al 0,2% (V/V) SFB. Esta muy baja concentración de SFB redundará en un menor costo del medio de cultivo y favorece el proceso de purificación de la molécula al disminuir la carga de proteínas contaminantes del producto crudo.

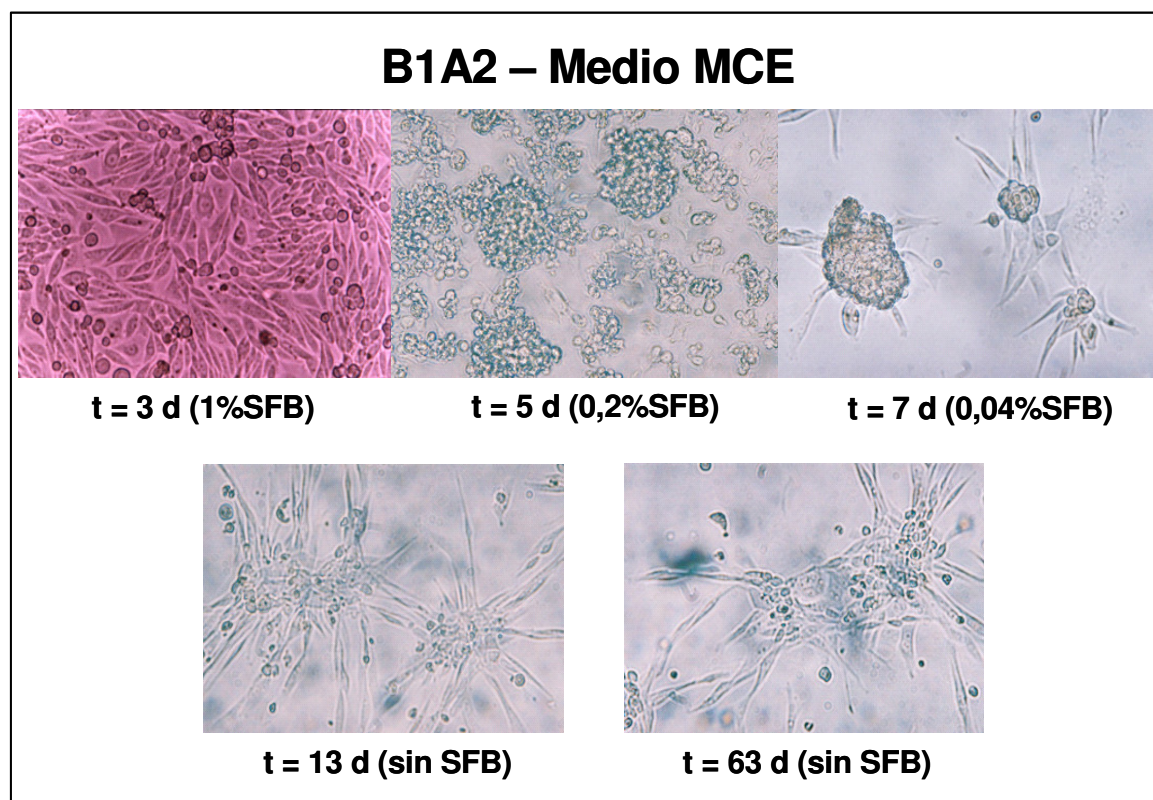


Fig. 15: Imágenes de las células del clon B1A2 durante el proceso de reducción progresiva de SFB y adaptación al crecimiento en suspensión en medio MCE.

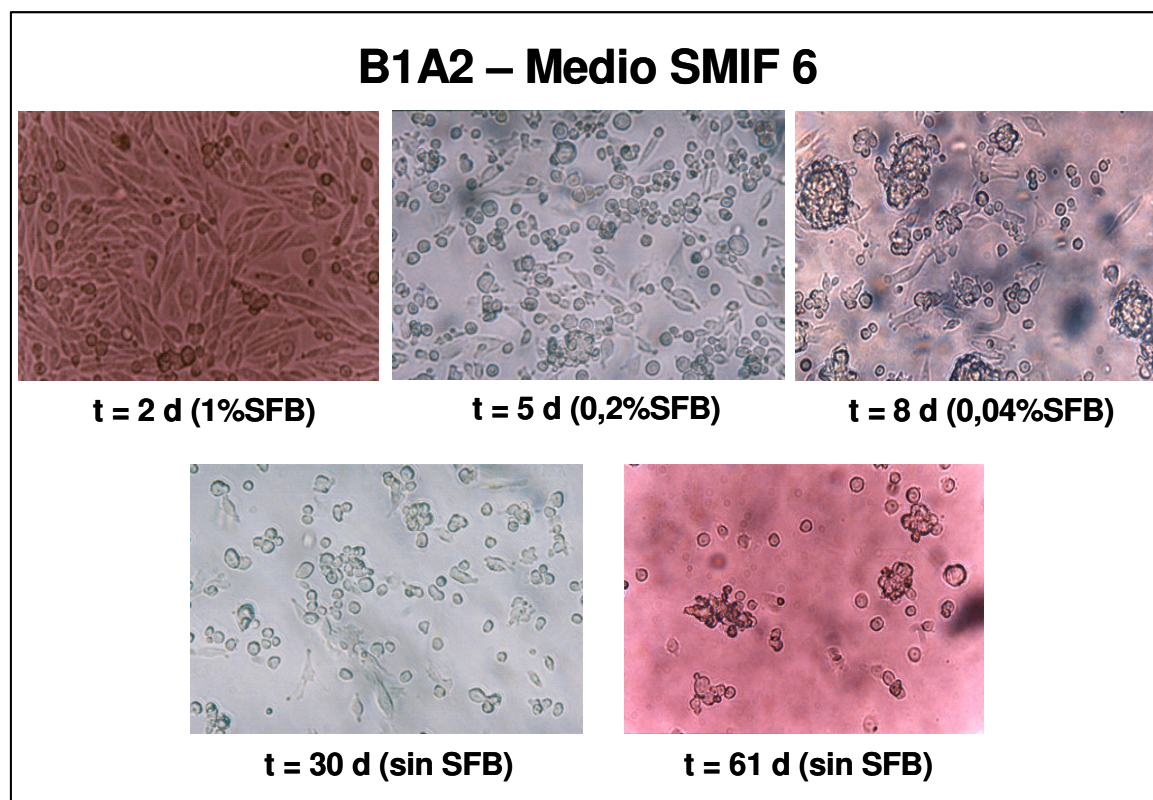


Fig. 16: Imágenes de las células del clon B1A2 durante el proceso de adaptación al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6.

4.4.7.3. Adaptación progresiva del clon B1A2 al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6

Se partió de cultivos del clon B1A2 en medio MCE al 2% (V/V) SFB, realizándose inicialmente un subcultivo de los mismos en una mezcla 1:1 de medio MCE:SMIF 6, siendo la concentración final de SFB de 2% (V/V). El siguiente subcultivo se realizó empleando una mezcla 1:4 de medio MCE:SMIF 6 manteniéndose la concentración de SFB, para finalmente cultivar el clon en medio SMIF 6 al 2% (V/V) SFB, sin que se verificaran variaciones en la cinética de crecimiento.

El siguiente subcultivo de las células se realizó en medio SMIF 6, siendo la concentración final de SFB de 1% (V/V). Parte de las células fueron criopreservadas, y el resto se cultivó hasta alcanzar el estado de superconfluencia. La adaptación del clon B1A2 se inició entonces con la sustitución parcial del sobrenadante de cultivos en frascos T tal como se señaló anteriormente, utilizándose el medio libre de proteínas SMIF 6 en los recambios. El esquema de recambios y el criterio seguido para establecer la frecuencia de los mismos son idénticos a los definidos para la adaptación de este clon al crecimiento en MCE reducido en SFB. Sin embargo, dado que el objetivo de esta experiencia era el de lograr la adaptación del clon al crecimiento en un medio libre de proteínas, no se realizaron subcultivos a diferentes concentraciones de SFB, sino que se continuó con el protocolo de recambios hasta reemplazar totalmente el sobrenadante por SMIF 6.

La Tabla XV resume los pasos realizados durante este proceso de adaptación, hasta lograr el reemplazo total del medio de cultivo MCE por SMIF 6.

Se verificó así que las células no fueron capaces de crecer en forma adherente en medio SMIF 6: la mayor parte de las células perdió su capacidad de adherencia al sustrato en este medio y pasó a suspensión, y no fue posible determinar la velocidad de crecimiento de las escasas células que permanecieron adheridas por ser demasiado baja. Estas células también presentaron una longitud mayor, tal como había ocurrido en el caso de la reducción de SFB en medio MCE, pero dado que su número fue muy inferior comparado con el caso anterior, no se observaron las formaciones en estrella previamente descritas.

En el quinto día posterior al inicio de la adaptación, las células que se hallaban en el sobrenadante de los cultivos fueron centrifugadas 8 min a 200 g y resuspendidas en frascos *spinner*, iniciándose así el cultivo en suspensión de las mismas. Las etapas de este proceso se resumen en la Tabla XVI.

Tabla XV: Adaptación del clon B1A2 al crecimiento en adherencia en el medio SMIF 6

ADHERENCIA		
Tiempo (días)	Observaciones	Conc. final de SFB
0	Se inicia el cultivo a alta densidad en frascos T 75 cm ²	1,0000%
2	Monocapa superconfluyente. Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,2000%
5	Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,0400%
10	Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,0080%
16	Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,0016%
21	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
25	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
30	Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
36	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
42	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
48	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
54	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
61	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
68	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
74	Se congeló 1 criotubo	0,0000%

El clon B1A2 fue adaptado exitosamente a crecer en suspensión en medio SMIF 6, ya que mostró una morfología y un crecimiento normales luego de los sucesivos subcultivos, si bien se observó una ligera disminución en la velocidad específica de crecimiento con respecto a la inicial. El cultivo en este medio alcanzó una densidad máxima de $9,1 \times 10^5$ cél. viables ml⁻¹, y las células adaptadas fueron preservadas en nitrógeno líquido.

Las imágenes obtenidas durante el proceso de adaptación (Fig. 16) muestran inicialmente un cambio en la forma de las células de la monocapa, las cuales se tornaron más redondeadas y quedaron débilmente adheridas al sustrato. Así, desde el primer recambio de sobrenadante por medio SMIF 6 se observó que gran parte de las células se desprendía del frasco, pasando al sobrenadante.

En la medida en que se avanzaba con el proceso volvieron a observarse cúmulos de células, aunque de menor tamaño (aproximadamente 100-300 μ m de diámetro), los que progresivamente se fueron disgregando y/o desprendiendo. Tal como se menciona anteriormente, varias veces se retiraron las células del sobrenadante de los cultivos en frascos T para agregarlas al frasco *spinner*. Finalmente casi la totalidad de las células se encontraba en suspensión en forma individual o en agrupaciones de pocas células, creciendo satisfactoriamente en este medio libre de proteínas.

Tabla XVI: Adaptación del clon B1A2 al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6.

SUSPENSIÓN		
Tiempo (días)	Observaciones	Conc. final de SFB
5	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se resuspende en una mezcla 1:4 de medio condicionado:SMIF 6	0,0400%
10	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> celular se agrega al <i>spinner</i> . La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en una mezcla 1:4 de medio condicionado:SMIF 6	0,0080%
16	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> celular se agrega al <i>spinner</i> . La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en una mezcla 1:4 de medio condicionado:SMIF 6	0,0016%
21	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> celular se agrega al <i>spinner</i> . La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en una mezcla 1:4 de medio condicionado:SMIF 6	0,0000%
24	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en SMIF 6	0,0000%
26	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en SMIF 6	0,0000%
27	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
29	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
30	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
33	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
38	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
43	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en SMIF 6	0,0000%
48	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
54	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en SMIF 6	0,0000%
58	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
60	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en SMIF 6	0,0000%
65	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
69	Se congelaron 5 criotubos	0,0000%

4.4.7.4. Adaptación progresiva del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en medio MCE

El protocolo seguido para adaptar al clon C4H8 al crecimiento en suspensión en MCE reducido en SFB fue análogo al realizado en el caso del clon B1A2, partiéndose de cultivos en adherencia en medio MCE al 2% (V/V) SFB. Luego de subcultivar este clon en MCE al 1% (V/V) SFB, parte de las células fueron congeladas mientras que el resto se cultivó hasta alcanzar superconfluencia. Con estos últimos cultivos se inició el proceso de sustitución parcial del sobrenadante por medio MCE sin agregado de SFB. Las etapas de este proceso se detallan en la Tabla XVII.

Tabla XVII: Adaptación del clon C4H8 al crecimiento en adherencia en el medio MCE reducido en SFB.

ADHERENCIA		
Tiempo (días)	Observaciones	Conc. final de SFB
0	Se inicia el cultivo a alta densidad en frascos T de 75 cm ²	1,0000%
3	Monocapa superconfluente. Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE	0,2000%
5	Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE del resto de los frascos T	0,0400%
7	Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE	0,0080%
9	Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE	0,0016%
11	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
14	Se recambian 4/5 del sobrenadante por MCE	0,0000%
17	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
23	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
33	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
41	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
48	Se recambia completamente el sobrenadante por MCE	0,0000%
49	Se descarta el frasco T, debido al número casi nulo de células que permanecieron adheridas	

El comportamiento del clon C4H8 durante el proceso de adaptación en este medio fue diferente al presentado por el clon B1A2. Al iniciar este proceso, el tamaño inicial de las células del clon C4H8 cultivadas en MCE al 2% (V/V) SFB era de aproximadamente 10 µm de diámetro por 50-60 µm de longitud, y presentaban una forma más redondeada que las células del otro clon. Desde el inicio del proceso las células perdieron completamente su forma original, adoptando cada una de ellas una forma esférica y pasando al sobrenadante, no ya como cúmulos sino como porciones de monocapa desprendidas del frasco; es decir, formando estructuras del espesor de una o dos células, y gran superficie. Estas estructuras fueron disgregándose gradualmente y liberando las células que la componían, las cuales no volvieron a adherirse al frasco.

De manera análoga a lo realizado con el clon B1A2, parte de las células desprendidas fueron separadas a distintos tiempos para ser subcultivadas en diferentes concentraciones de SFB: 0,2%, 0,04% y 0,008% (V/V). De estos subcultivos, solamente aquél en MCE al 0,2% (V/V) SFB prosperó, y pasadas 48-72 h las células volvieron a adherirse al fondo del frasco de cultivo. Por el contrario, las células cultivadas al 0,04% y 0,008% (V/V) SFB permanecieron en suspensión, por lo que a pesar de mantener su viabilidad no pudo concluirse que hayan sido adaptados a crecer en adherencia en MCE a estas concentraciones tan reducidas de suero. Luego de sucesivos subcultivos del clon en

MCE al 0,2% (V/V) SFB se consideró que éste había sido adaptado satisfactoriamente a estas condiciones al mostrar una velocidad de crecimiento y morfología normales. Al reducir luego el contenido de SFB a 0,1% (V/V) se verificó una disminución de la velocidad de crecimiento, por lo que se decidió considerar que la concentración mínima de SFB requerida por estas células era el doble de ésta, al igual que ocurriera con el clon B1A2.

Paralelamente, en la medida en que se avanzaba con el esquema de recambios se observó que no quedaban casi células adheridas, por lo que no fue posible congelar estas células y, en consecuencia, este clon no pudo ser adaptado a crecer en adherencia en MCE en ausencia de SFB. Las células que gradualmente pasaban al sobrenadante se utilizaron para inocular el cultivo en frasco *spinner*, iniciando así el proceso de adaptación a suspensión del clon C4H8 en medio MCE con una concentración reducida de SFB. Los pasos seguidos durante este proceso se resumen en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII: Adaptación del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en el medio MCE reducido en SFB.

SUSPENSIÓN		
Tiempo (días)	Observaciones	Conc. final de SFB
9	El sobrenadante retirado de los frascos T se centrifuga y el <i>pellet</i> se resuspende en una mezcla 1:4 de medio condicionado:MCE, iniciando el cultivo en <i>spinner</i>	0,0016%
11	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se agrega al <i>spinner</i>	0,0016%
13	Se centrifuga el volumen total de la suspensión y el <i>pellet</i> celular se resuspende en medio MCE sin SFB	0,0000%
14	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se agrega al <i>spinner</i>	0,0000%
16	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en una mezcla 1:4 de medio condicionado:MCE	0,0000%
17	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con MCE	0,0000%
20	Se hace una dilución 1/10 de la suspensión con MCE	0,0000%
25	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con MCE	0,0000%
30	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con MCE	0,0000%
35	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con MCE	0,0000%
39	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
42	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
50	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en MCE	0,0000%
53	Se hace una dilución 1/3 de la suspensión con MCE	0,0000%
55	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con MCE	0,0000%
57	Se congelaron 5 criotubos	0,0000%

El día 5 desde el inicio del proceso, el sobrenadante de cultivo proveniente del frasco T fue centrifugado y el *pellet* celular resuspendido en MCE al 0,2% (V/V) SFB en un frasco *spinner* para mantener un cultivo del clon en estas condiciones. El clon C4H8 se adaptó rápidamente al crecimiento en este medio de cultivo, alcanzando una densidad celular alta ($8,9 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1}) con un tiempo de duplicación similar al del cultivo inicial. Posteriormente, el día 9 se determinó que la concentración de células en el sobrenadante era suficiente para iniciar la adaptación del cultivo al crecimiento en suspensión en medio MCE con el fin de reducir progresivamente la concentración de SFB.

Las células cosechadas el día 9 mostraron, de manera sorprendente, un crecimiento sostenido en el tiempo en MCE sin agregado de SFB, si bien la velocidad de crecimiento se vio muy disminuida con respecto a la inicial y la concentración máxima de células alcanzada en estas condiciones ($5,4 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1}) fue de aproximadamente un 50% del valor máximo alcanzado en el cultivo en MCE al 0,2% (V/V) SFB. El crecimiento de las células en estas condiciones permitió que se realizaran sucesivos subcultivos a partir de la suspensión y que se obtuviera una masa celular suficiente para ser congelada en 5 criotubos.

El proceso de adaptación se muestra en las Fig. 17. Puede observarse cómo las células adoptaron una forma esférica y fragmentos de la monocapa pasaron al sobrenadante para finalmente liberar las células, las cuales se desarrollaron en forma individual o como pequeños agregados.

4.4.7.5. Adaptación progresiva del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6

El proceso de adaptación del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en medio libre de proteínas se llevó a cabo tal como se describió previamente para el clon B1A2: en primer lugar, cultivos en adherencia de este clon en medio MCE al 2% (V/V) SFB fueron subcultivados en una mezcla 1:1 de MCE:SMIF 6, manteniéndose la concentración inicial de SFB. El siguiente subcultivo se realizó empleando una mezcla 1:4 de MCE:SMIF 6 (concentración final de 2%(V/V) SFB), para luego repicar estas células en medio SMIF 6 al 2% (V/V) SFB. Tampoco en este caso se observaron variaciones en la cinética de crecimiento respecto al medio original MCE. El subcultivo posterior de estas células se llevó a cabo con medio SMIF 6 1% (V/V) SFB. Una parte de este cultivo fue criopreservado, y la otra se cultivó hasta el estado de monocapa superconfluyente, con el fin de dar inicio al proceso de adaptación al crecimiento en suspensión.

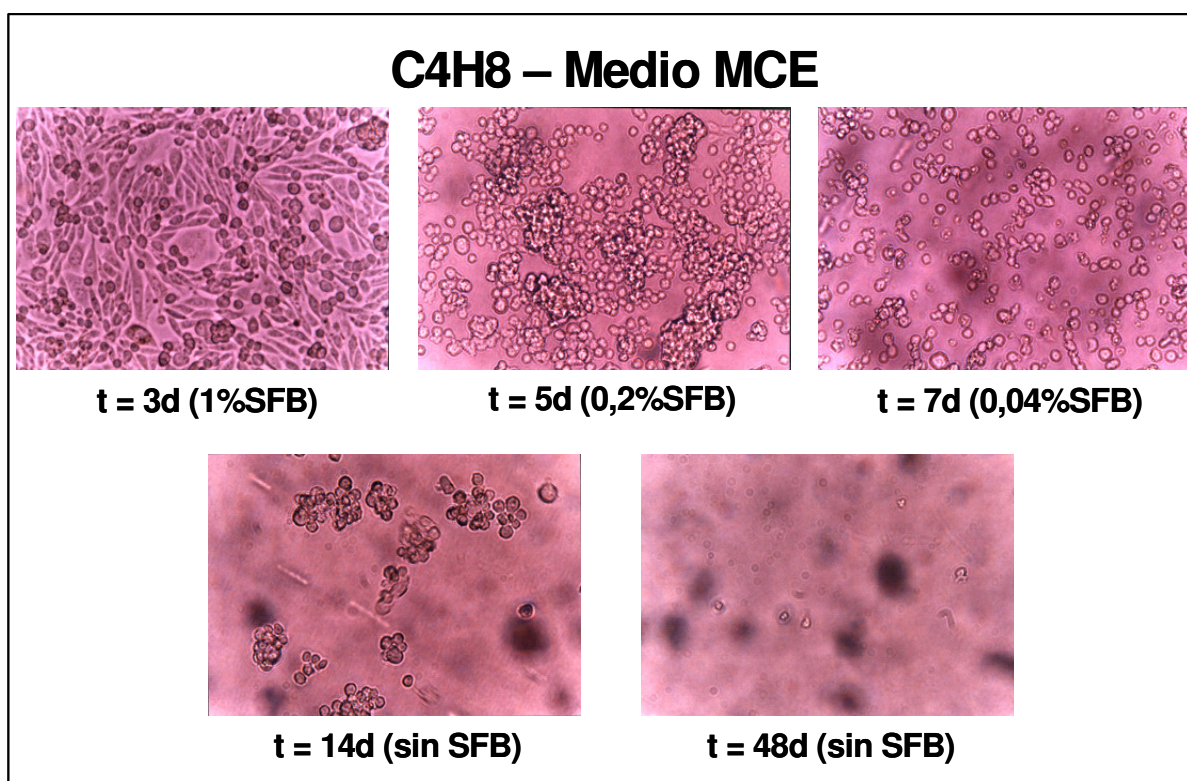


Fig. 17: Imágenes de las células del clon C4H8 durante el proceso de reducción progresiva de SFB y adaptación al crecimiento en suspensión en medio MCE.

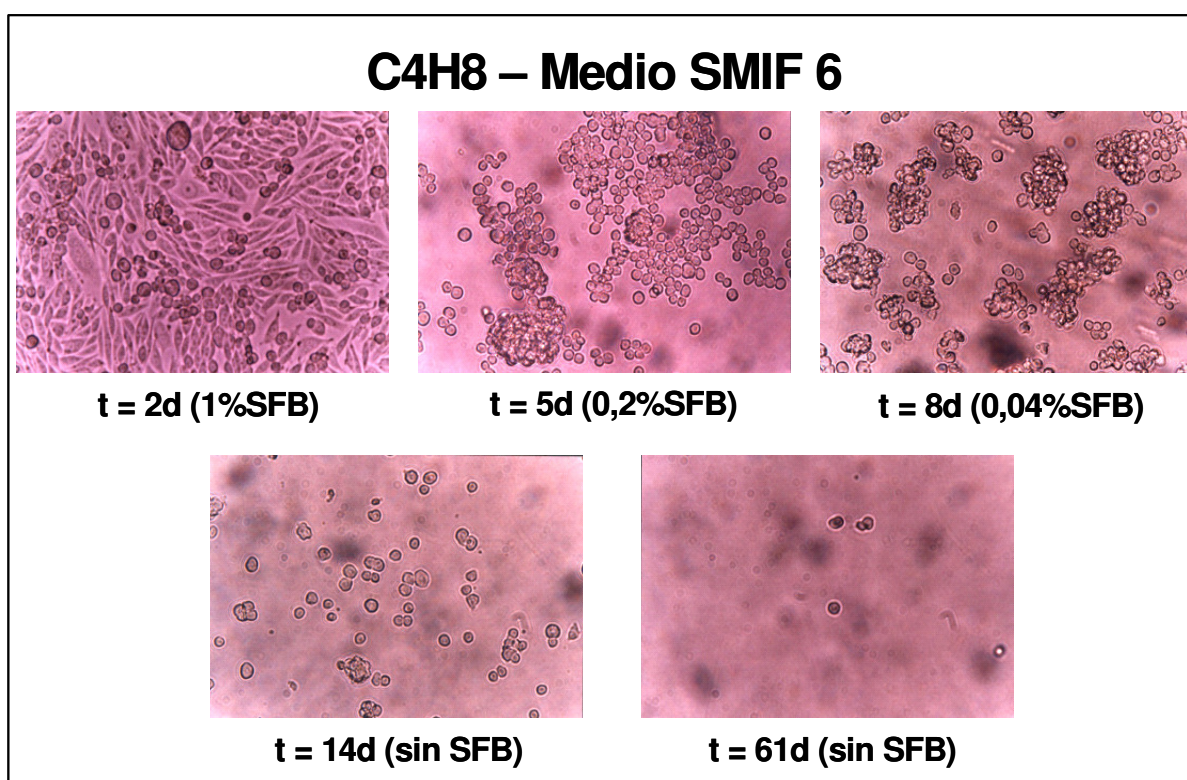


Fig. 18: Imágenes de las células del clon C4H8 durante el proceso de adaptación al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6.

El esquema de recambios realizados durante este proceso se presenta en la Tabla XIX.

Tabla XIX: Adaptación del clon C4H8 al crecimiento en adherencia en el medio SMIF 6.

ADHERENCIA		
Tiempo (días)	Observaciones	Conc. final de SFB
0	Se inicia el cultivo a alta densidad en frascos T 75 cm ²	1,0000%
2	Monocapa. Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,2000%
5	Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,0400%
8	Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,0080%
11	Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,0016%
14	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
20	Se recambian 4/5 del sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
25	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
33	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
41	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
48	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
54	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
61	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
67	Se recambia completamente el sobrenadante por SMIF 6	0,0000%
74	Se congeló 1 criotubo libre de SFB	0,0000%

Al igual que lo ocurrido durante la adaptación en el medio MCE, al disminuirse el contenido de suero del medio, las células adquirieron rápidamente una forma esférica, y paulatinamente perdieron su adhesión al sustrato, pasando al sobrenadante de manera individual o en pequeños agregados. En la medida en que avanzaba este proceso, casi la totalidad de las células se desprendieron del frasco, y a pesar de que las células que permanecieron adheridas presentaban una adecuada viabilidad, su bajo número permitió congelar solamente un criotubo de baja densidad celular.

Un estudio posterior mostró que el agregado de una cantidad tan pequeña como 0,005% (V/V) SFB al clon C4H8 en SMIF 6 permitió incrementar su velocidad de crecimiento cuando se lo cultiva en adherencia, aunque su valor normal inicial no fue recuperado. A partir de este cultivo se criopreservaron dos criotubos de baja densidad celular. Estas observaciones se discutirán más adelante.

Las células cosechadas el día 8 se utilizaron como inóculo del frasco *spinner*,

lográndose una rápida adaptación de este clon al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6, tal como puede observarse en la Tabla XX.

Tabla XX: Adaptación del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en el medio SMIF 6.

SUSPENSIÓN		
Tiempo (días)	Observaciones	Conc. final de SFB
8	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se resuspende en una mezcla 1:4 de medio condicionado:SMIF 6	0,0080%
11	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se agrega al <i>spinner</i>	0,0080%
13	Se centrifuga el volumen total del cultivo y el <i>pellet</i> celular se resuspende en una mezcla 1:4 de medio condicionado:SMIF 6	0,0016%
14	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se agrega al <i>spinner</i>	0,0016%
17	Se centrifuga el volumen total del cultivo y el <i>pellet</i> se resuspende en SMIF 6	0,0000%
20	El sobrenadante retirado del frasco T se centrifuga y el <i>pellet</i> se agrega al <i>spinner</i>	0,0000%
21	La suspensión se centrifuga y se resuspende el <i>pellet</i> en una mezcla 1:4 de medio condicionado:SMIF 6	0,0000%
23	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
26	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
30	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
33	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
37	Se hace una dilución 1/5 de la suspensión con SMIF 6	0,0000%
43	Se congelaron 5 criotubos	0,0000%

Luego de tres semanas de iniciada la adaptación y sólo dos desde el inicio del cultivo en suspensión propiamente dicho, el clon C4H8 presentaba una alta velocidad de replicación y un crecimiento sostenido luego de realizados varios subcultivos, indicando así que el proceso de adaptación se había completado con éxito. La alta densidad celular alcanzada en este cultivo ($1,2 \times 10^6$ cél. viables ml^{-1}) fue suficiente para congelar cinco criotubos.

El proceso de adaptación del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en medio SMIF 6 se presenta en la Fig. 18.

4.4.7.6. Adaptación del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en un paso

Cuando se intenta adaptar células de mamífero al crecimiento en suspensión frecuentemente se sigue una metodología muy simple, cuyo único paso consiste en tomar las células que originalmente crecen en adherencia y sembrar con ellas un frasco *spinner*,

permitiendo la selección natural de aquéllas que mejor se adapten (y consigan replicarse) en estas condiciones de cultivo agitado. Este drástico cambio en el ambiente que rodea a las células puede tener efectos negativos sobre el metabolismo, principalmente debido al estrés mecánico al que se ven sometidas las células, las que hasta ese momento crecían de manera normal adheridas al sustrato. Estos efectos negativos pueden no ser percibidos en un principio, por ejemplo como ocurre con las alteraciones en el perfil de glicosilación, las que pueden presentarse aún cuando no se manifiesten cambios en el crecimiento o en otros parámetros metabólicos.

Con el fin de estudiar el posible efecto de la metodología seguida para la adaptación al crecimiento en suspensión sobre el crecimiento y metabolismo celulares, el clon C4H8 se cultivó en frasco *spinner* con medio MCE al 0,2% (V/V) SFB, de acuerdo con el denominado método de un único paso. Para ello, a partir de cultivos en monocapa superconfluyente creciendo en ese mismo medio se procedió a desprender suavemente con pipeta aquellas células que crecían por sobre las células adheridas al frasco de cultivo. Luego de este procedimiento, el sobrenadante – el cual además contenía las células que se hallaban en activa división – fue retirado y centrifugado durante 8 min a 200 *g*. El *pellet* celular se resuspendió en un volumen final de 40 ml, constituido por partes iguales de medio condicionado y medio fresco al 0,2% (V/V) SFB, en un frasco *spinner*. Igual procedimiento se siguió empleando SMIF 6 al 0,2% (V/V) SFB como medio para la adaptación al crecimiento en suspensión en un solo paso.

En una primera instancia las células que se encontraban en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB tendieron a formar pequeños agregados, de aproximadamente 10-15 células de diámetro, verificándose además una etapa *lag* de 72 horas hasta observar señales de crecimiento. Inicialmente la viabilidad de este cultivo fue muy baja (<50%), resultando muy difícil realizar recuentos fidedignos debido a la presencia de los agregados celulares. Progresivamente estos últimos fueron disgregándose, la viabilidad elevándose y el cultivo incrementando su velocidad de crecimiento hasta valores normales, por lo que se consideró apropiado subcultivar este clon por dilución con medio fresco. La adaptación se consideró exitosa al cabo de cuatro semanas.

Las células en medio SMIF 6 al 0,2% (V/V) SFB no formaron agregados, manteniéndose en forma aislada desde el inicio. La viabilidad inicial (aproximadamente 65%) se mantuvo prácticamente constante durante los primeros 7 días. A las 96 horas se realizó el primer subcultivo por dilución, y a los 25 días después del inicio del proceso, las células se consideraron adaptadas al crecimiento en suspensión. El clon C4H8 adaptado en forma progresiva se denominó entonces **clon C4H8c**, y el adaptado por el método de un paso, **clon C4H8d**.

4.4.8. Evaluación del crecimiento y productividad de los clones B1A2, C4H8c y C4H8d en diferentes sistemas y medios de cultivo

Resulta evidente que variaciones en la composición del medio utilizado para cultivar un determinado clon afectan directamente el crecimiento y la productividad del mismo, siendo que diferentes nutrientes y/o sus concentraciones favorecen la utilización de distintas vías metabólicas, y proveen cantidades variables de energía y sustratos anabólicos. En particular, el suero fetal bovino que se adiciona a los medios de cultivo tradicionales aporta factores de crecimiento, hormonas, proteínas receptoras y de transporte, como ya se ha indicado anteriormente.

En forma análoga, el metabolismo y/o la productividad de un clon también pueden verse afectados por el proceso de adaptación al cultivo en suspensión. Debido a estas consideraciones se procedió a caracterizar el crecimiento y productividad de los clones en estudio, evaluando el efecto que sobre ellos pudieran ejercer la composición de diferentes medios de cultivo, los protocolos de adaptación a suspensión y los sistemas de cultivo.

En una primera experiencia se describe el análisis del comportamiento del clon C4H8 antes y después de ser adaptado siguiendo el protocolo de Scharfenberg y Wagner modificado, en medio SMIF 6 el cual fue enriquecido con concentraciones variables de SFB.

En experiencias posteriores se evalúa el efecto de la metodología seguida para la adaptación al crecimiento en suspensión, al comparar el comportamiento de los clones C4H8c y C4H8d, tanto en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB como en medio SMIF 6. En este último diseño se incluyó además al clon B1A2, cultivado en suspensión en ambos medios de cultivo, con el fin de seleccionar finalmente el clon que sería utilizado en la siguiente etapa de este trabajo de tesis.

4.4.8.1. Evaluación del crecimiento y la productividad del clon C4H8c antes y después de la adaptación a suspensión en diferentes medios de cultivo

En las siguientes experiencias se evaluó el efecto del proceso de adaptación a suspensión sobre el crecimiento y metabolismo celulares, al comparar los parámetros específicos de crecimiento del clon C4H8 antes y después de la adaptación, cuando ésta se realizó siguiendo el protocolo de Scharfenberg y Wagner modificado. Se estudió, además, el efecto de la adición de SFB en diferentes concentraciones al medio SMIF 6, tanto para el caso del cultivo del clon C4H8 en adherencia como en suspensión.

Para ello, se procedió a cultivar el clon C4H8 a partir de células de ese clon que habían sido preservadas en nitrógeno líquido en diferentes momentos:

- un criotubo del clon C4H8 cultivado en adherencia en medio SMIF 6 al 1% (V/V) SFB, congelado antes de iniciar el proceso de adaptación a suspensión;
- un criotubo del clon C4H8 cultivado en adherencia en medio SMIF 6 al 0,005% (V/V) SFB, congelado al final del proceso de adaptación a suspensión a partir de aquellas células que aún permanecían adheridas;
- un criotubo del clon C4H8c.

A partir del cultivo en adherencia al 1% (V/V) SFB se realizó un subcultivo en medio SMIF 6 al 0,5% (V/V) SFB, y a partir de éste, otro subcultivo al 0,2% (V/V) SFB. El clon cultivado en SMIF 6 al 0,005% (V/V) SFB fue amplificado, utilizándose una parte del cultivo para realizar un subcultivo en medio SMIF 6 sin adición de SFB.

Con estos cultivos se sembraron tres placas de poliestireno de 12 cavidades a razón de 4 ml de suspensión celular por cavidad, y 8 cavidades para cada uno de los medios evaluados:

- SMIF 6 al 1% (V/V) SFB
- SMIF 6 al 0,2% (V/V) SFB
- SMIF 6 al 0,005% (V/V) SFB
- SMIF 6 sin adición de SFB

Se sembraron además 4 frascos *spinner* con una densidad inicial de 2×10^5 cél. viables ml^{-1} , cultivando el clon C4H8c en los medios de cultivo previamente indicados para la experiencia en adherencia.

Diariamente se tomó una muestra de cada cultivo con el fin de realizar el recuento celular, guardando posteriormente el sobrenadante libre de células a -20°C para la determinación de metabolitos. En el caso de los cultivos en placa se verificó que en la medida en que se reducía el contenido de SFB del medio de cultivo las células perdían proporcionalmente su capacidad de adhesión al sustrato y pasaban al sobrenadante, en forma análoga a lo observado durante el proceso de adaptación a suspensión descrito anteriormente. Por esta razón, y debido a que probablemente muchas de las células que se encontraban en el sobrenadante eran viables (y en consecuencia, consumían nutrientes y secretaban metabolitos), se procedió de la siguiente manera: en primer lugar se tomaba una muestra del sobrenadante de cada cavidad, homogeneizando suavemente con pipeta, sobre la cual se realizaba el recuento de las células desprendidas. Este sobrenadante era centrifugado y conservado como se indicó anteriormente, para realizar posteriormente la determinación de metabolitos. A continuación se procedía a realizar el recuento de las

células que permanecían adheridas, para lo cual se requirió del uso de tripsina para desprenderlas del fondo de la cavidad cuando las células eran cultivadas al 1% (V/V) SFB. Se realizó siempre un control al microcopio para verificar que todas las células hubiesen sido desprendidas del sustrato. Los recuentos correspondientes a las células que crecían en el sobrenadante así como adheridas fueron sumados para obtener la concentración total de células creciendo en la cavidad, y con estos valores se realizaron las gráficas de crecimiento que se muestran en la Fig. 19.

Los datos experimentales obtenidos a partir de los cultivos en suspensión del clon C4H8c se presentan en la Fig. 20, mientras que las velocidades específicas de consumo y producción correspondientes a los cultivos tanto en adherencia como en suspensión se detallan en las Tablas XXI y XXII, respectivamente.

Tabla XXI: Parámetros metabólicos específicos del clon C4H8c cultivado en adherencia en medio SMIF 6 con diferentes concentraciones de SFB.

Parámetro	Adherencia 1% SFB	Adherencia 0,2% SFB	Adherencia 0,005% SFB	Adherencia sin SFB
μ (h^{-1})	0,035±0,004 <i>R=0,99</i> <i>P=0,076</i>	0,0309±0,0008 <i>R=0,99</i> <i>P=0,0007</i>	0,019±0,001 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	0,020±0,001 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>
q_{glc}^{glc} ($nmol\ 10^6\ cél^{-1}h^{-1}$)	259±21 <i>R=0,98</i> <i>P<0,0001</i>	227±30 <i>R=0,97</i> <i>P0,002</i>	205±24 <i>R=0,96</i> <i>P=0,0001</i>	231±22 <i>R=0,97</i> <i>P<0,0001</i>
q_{lac}^{lac} ($nmol\ 10^6\ cél^{-1}h^{-1}$)	409±49 <i>R=0,96</i> <i>P=0,0002</i>	401±19 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	365±35 <i>R=0,98</i> <i>P=0,0002</i>	452±38 <i>R=0,98</i> <i>P<0,0001</i>
q_{am}^{am} ($nmol\ 10^6\ cél^{-1}h^{-1}$)	17±2 <i>R=0,99</i> <i>P=0,076</i>	20±2 <i>R=0,99</i> <i>P=0,0008</i>	30±3 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	113±21 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>
q_{gln}^{gln} ($nmol\ 10^6\ cél^{-1}h^{-1}$)	25±2 <i>R=0,98</i> <i>P<0,0001</i>	42±4 <i>R=0,97</i> <i>P0,002</i>	46±5 <i>R=0,96</i> <i>P=0,0002</i>	61±4 <i>R=0,97</i> <i>P<0,0001</i>
q_{glu}^{glu} ($nmol\ 10^6\ cél^{-1}h^{-1}$)	12±1 <i>R=0,96</i> <i>P=0,0002</i>	13±1 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	20±2 <i>R=0,98</i> <i>P=0,0002</i>	28±3 <i>R=0,98</i> <i>P<0,0001</i>
q_{rhEPO}^{rhEPO} ($\% 10^{-6}\ cél^{-1}h^{-1}$)	0,041±0,007 <i>R=0,92</i> <i>P=0,023</i>	0,145±0,022 <i>R=0,97</i> <i>P=0,0008</i>	0,135±0,008 <i>R=0,98</i> <i>P=0,0005</i>	0,168±0,013 <i>R=0,97</i> <i>P=0,089</i>

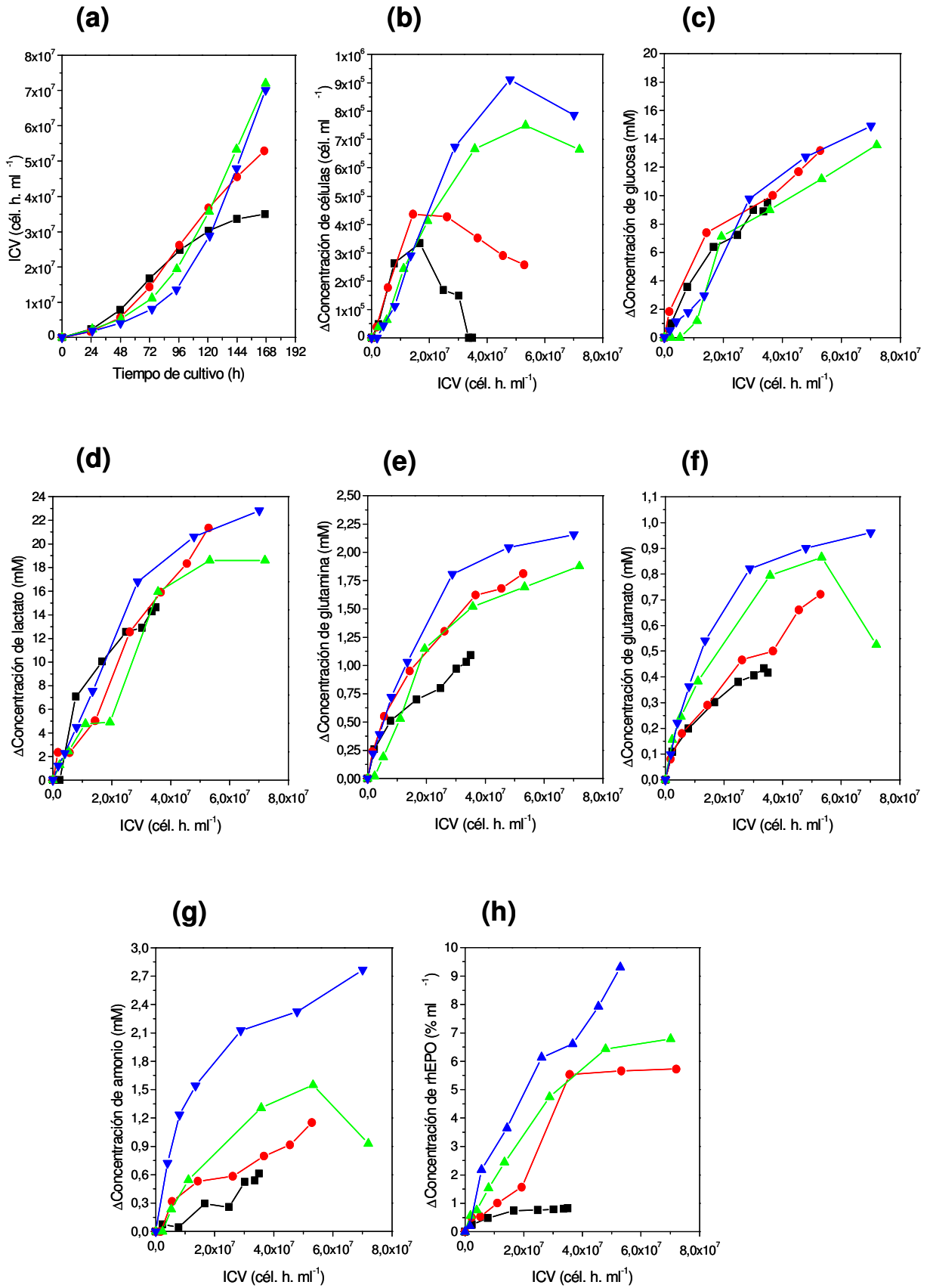


Fig. 19: Curvas de (a) ICV, (b) células, (c) glucosa, (d) lactato, (e) glutamina, (f) glutamato, (g) amonio y (h) rhEPO para los cultivos en adherencia del clon C4H8 en medio SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de SFB. (■) 1% SFB, (●) 0,2% SFB, (▲) 0,005% SFB, (▼) sin SFB.

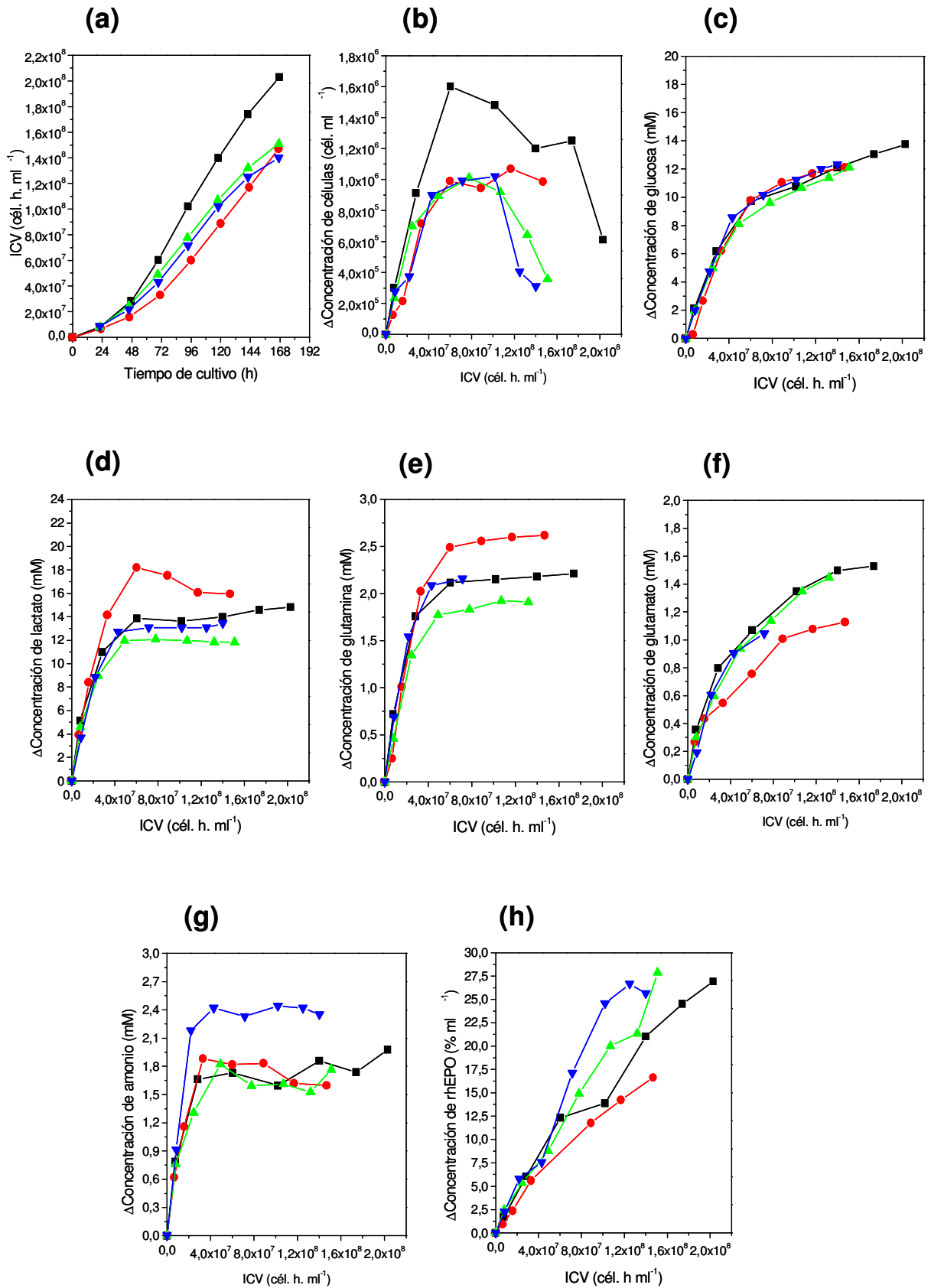


Fig. 20: Curvas de (a) ICV, (b) células, (c) glucosa, (d) lactato, (e) glutamina, (f) glutamato, (g) amonio y (h) rhEPO para los cultivos en suspensión del clon C4H8 en medio SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de SFB. (■) 1% SFB, (●) 0,2% SFB, (▲) 0,005% SFB, (▼) sin SFB.

Tabla XXII: Parámetros metabólicos específicos del clon C4H8c cultivado en suspensión en medio SMIF 6 con diferentes concentraciones de SFB.

Parámetro	Suspensión 1% SFB	Suspensión 0,2% SFB	Suspensión 0,005% SFB	Suspensión sin SFB
μ (h ⁻¹)	0,026±0,002 R=0,99 P=0,006	0,017±0,002 R=0,98 P=0,003	0,018±0,004 R=0,96 P=0,041	0,020±0,003 R=0,95 P=0,0003
q_{glc} (nmol 10 ⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	158±20 R=0,98 P=0,016	172±13 R=0,99 P=0,001	163±15 R=0,99 P=0,008	198±8 R=0,99 P<0,0001
q_{lac} (nmol 10 ⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	366±81 R=0,98 P=0,139	296±46 R=0,97 P=0,008	348±76 R=0,98 P=0,137	293±43 R=0,98 P=0,018
q_{am} (nmol 10 ⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	55±13 R=0,99 P=0,006	55±7 R=0,98 P=0,003	50±15 R=0,96 P=0,041	99±4 R=0,99 P=0,001
q_{gln} (nmol 10 ⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	59±9 R=0,98 P=0,016	63±4 R=0,99 P=0,001	54±1 R=0,99 P=0,008	48±9 R=0,98 P=0,021
q_{glu} (nmol 10 ⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	27±5 R=0,98 P=0,121	27±6 R=0,97 P=0,008	18±2 R=0,98 P=0,137	21±3 R=0,99 P=0,024
q_{rhEPO} (% 10 ⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	0,142±0,014 R=0,97 P=0,003	0,115±0,006 R=0,98 P=0,005	0,173±0,008 R=0,96 P=0,021	0,237±0,015 R=0,97 P=0,011

Los valores de $Y_{lac/glc}$ y de $Y_{am/gln}$ obtenidos para los diferentes cultivos del clon C4H8c, tanto en adherencia como en suspensión se presentan en la Tabla XXIII.

Tabla XXIII: Valores de $Y_{lac/glc}$ e $Y_{am/gln}$ obtenidos en diferentes condiciones de cultivo del clon C4H8c.

Cultivo	$Y_{lac/glc}$	$Y_{am/gln}$
Adherencia 1% SFB	1,6±0,2	0,62±0,09
Adherencia 0,2% SFB	1,8±0,2	0,47±0,06
Adherencia 0,005% SFB	1,8±0,3	0,66±0,09
Adherencia sin SFB	2,0±0,2	1,9±0,4
Suspensión 1% SFB	2,3±0,6	0,9±0,2
Suspensión 0,2% SFB	1,7±0,2	0,9±0,1
Suspensión 0,005% SFB	2,1±0,5	0,9±0,3
Suspensión sin SFB	1,5±0,2	2,1±0,5

4.4.8.2. Efecto de la adición de SFB al medio de cultivo SMIF 6

Cultivos en adherencia:

En estos cultivos se observó un efecto muy significativo de la concentración de suero, tanto sobre las velocidades específicas de consumo/producción como sobre las cinéticas de estos procesos. Los cultivos con una concentración reducida o nula de suero (0,005% y 0%) presentaron valores de μ inferiores a aquéllos con mayor contenido de SFB, pero estas velocidades se mantuvieron constantes durante más tiempo, obteniéndose así concentraciones celulares máximas y valores de ICV significativamente más altos. Esto coincide con lo informado por Ramírez y Mutharasan (1990), quienes sugirieron que una baja velocidad de crecimiento es esencial para la preservación de la viabilidad de los cultivos por más tiempo. En los cultivos con una mayor concentración de suero se verificó una breve fase de crecimiento estacionaria iniciándose luego una fase de muerte que no fue observada en los cultivos con muy bajo o nulo contenido de SFB.

Los perfiles de consumo de glucosa y producción de lactato fueron, sin embargo, similares en todos los cultivos – considerando las diferencias observadas en las densidades celulares alcanzadas –, sin observarse un efecto de la adición de SFB sobre ellos. Se destaca, como era esperable, la alta correlación entre estas curvas, confirmando la directa relación que existe entre el flujo glicolítico y la síntesis de este ácido orgánico.

Llamativamente, todos los parámetros evaluados, con excepción de q_{glc} y q_{lac} , mostraron una gran dependencia de la concentración de SFB, decreciendo en cuanto la concentración de éste se incrementaba. Las curvas de producción de glutamato se correlacionan con las de consumo de glutamina, aunque no se verifica una relación equimolar entre ellas, lo que indica que una fracción de la glutamina sufre otro tipo de reacción diferente a su desaminación por la glutaminasa (Street y col., 1993). Estas reacciones podrían ser extracelulares (como su descomposición térmica o enzimática en el medio de cultivo) o intracelulares (como la síntesis de purinas, pirimidinas, azúcares activados, lactato).

Una gran variabilidad dependiente del suero se observó en la cinética de producción de amonio, lo que se evidenció en los valores más altos de $Y_{\text{am/gln}}$ obtenidos para los cultivos con menor o nula concentración de suero.

El medio de cultivo con el cual se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a crecimiento y productividad de rhEPO fue el SMIF 6 sin adición de SFB. En este cultivo el valor de q_{rhEPO} , además de ser superior al resto, se mantuvo constante hasta el final del cultivo, permitiendo alcanzar una producción volumétrica de rhEPO un 35% más alta, aproximadamente, que en el cultivo con 0,005% (V/V) SFB.

El medio SMIF 6 es un medio complejo en cantidad y calidad de nutrientes, ya que fue especialmente formulado para ser utilizado sin SFB, y por ello se estimaba que el agregado de SFB al mismo tuviera un efecto nulo, tal vez beneficioso, sobre el crecimiento y la productividad celulares. De esta manera resultan llamativos los resultados obtenidos, en los cuales la adición de SFB al medio SMIF 6 pareciera ejercer un efecto contrario al esperado. Es posible que la mayor adherencia de las células al sustrato verificada en presencia de altas concentraciones de SFB restringiera el desarrollo celular debido al fenómeno conocido como *inhibición por contacto*. Los cultivos con concentraciones menores de suero, en los cuales las células eran capaces de pasar al sobrenadante y, en consecuencia, no sufrirían los efectos atribuidos a la restricción de superficie de crecimiento alcanzaron así mayores concentraciones celulares, comparables a las obtenidas en los cultivos en suspensión. El menor crecimiento celular de los cultivos con mayor contenido de suero justificaría la menor producción volumétrica de glutamato, lactato, amonio y rhEPO, así como la mayor concentración remanente de nutrientes (glucosa y glutamina). Las variaciones en las cinéticas de consumo/producción, sin embargo, no pueden ser explicadas por la diferencia en la densidad celular alcanzada, por lo que se encuentran asociadas a la presencia de suero, dependiendo directamente de su concentración en el medio de cultivo. Merece destacarse que el efecto del SFB sobre el metabolismo celular se verifica, en las condiciones ensayadas, aún en concentraciones tan extremadamente bajas como 50 ppm. Tanto la variabilidad lote a lote del SFB (Leist y col., 1990) como el pretratamiento que sufre el suero (inactivación por calor, por ejemplo) (Schneider y col., 1996) requieren que este límite de efectividad sean confirmadas para cada nuevo conjunto de condiciones operativas (clon, medio de cultivo, temperatura, lote de suero, etc.).

Cultivos en suspensión:

Con respecto a estos cultivos, se observaron diferencias con los resultados obtenidos en adherencia. El cultivo que presentó la mayor velocidad específica de crecimiento y la más alta concentración celular máxima fue aquél con la mayor concentración de SFB (1%). Esto indicaría que en suspensión el SFB en alta concentración tiene un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las células, el cual se vería contrarrestado en los cultivos en adherencia por el mencionado fenómeno de inhibición por contacto. Se ha propuesto que las proteínas aportadas por el suero, cuando éste se encuentra en alta concentración en el medio de cultivo, ejercerían un efecto citoprotector frente al estrés mecánico de la agitación (Leist y col., 1990).

La cinética de consumo de glucosa fue similar para todas las concentraciones

ensayadas, confirmando que el SFB no tiene un efecto sobre el metabolismo de este azúcar, independientemente del sistema de cultivo utilizado. Con referencia al lactato, durante los primeros días de cultivo se verificó un comportamiento análogo entre las condiciones evaluadas, con un incremento sostenido en la concentración del mismo. A partir de las 48 h-72 h el valor de q_{lac} comenzó a disminuir, llegando a valores cercanos a cero. Este hecho podría deberse tanto a una inhibición en la síntesis de lactato como a un equilibrio entre su velocidad de producción y su velocidad de consumo. La producción de lactato en forma sostenida hasta el final del cultivo ocurrida en los cultivos en adherencia apunta a la segunda opción como más factible, la cual será discutida más adelante.

Las curvas de consumo de glutamina y producción de glutamato mostraron un comportamiento bifásico, al igual que el observado para la glucosa y el lactato, con una alta velocidad específica inicial y una desaceleración, ya sea del consumo o producción, a partir del segundo o tercer día de cultivo, con una diferencia menos marcada entre las diferentes concentraciones de suero evaluadas.

En cuanto a la producción de amonio, los resultados obtenidos en suspensión confirman las observaciones previas verificadas en los cultivos adherentes, con una concentración de este ion significativamente más alta en el medio de cultivo sin adición de SFB. Este hecho podría deberse a un *switch* metabólico ocurrido en ausencia de suero, el cual no se verifica cuando se adiciona SFB al medio, aún en mínimas cantidades.

De manera análoga a lo observado en los cultivos en placa, los valores de velocidad específica de producción de rhEPO de las suspensiones crecidas en condiciones de bajo suero o sin él fueron superiores a las de aquellos cultivos con 0,2% o 1% (V/V) SFB. Bajo ninguna de las condiciones ensayadas, sin embargo, se observó la degradación de la rhEPO en el sobrenadante de cultivo, como fuera informado por Yoon y col. (2005) en sus experiencias de cultivo en suspensión de células CHO en modo *batch*, usando un medio libre de proteínas.

4.4.8.3. Efecto del sistema de cultivo

Crecimiento celular:

Desde el punto de vista del sistema de cultivo empleado – adherencia o suspensión – se observa un comportamiento muy disímil entre las células cultivadas en uno u otro sistema en presencia de suero. Esto se verifica de manera clara en los cultivos en medio SMIF 6 adicionado de 1% (V/V) SFB, probablemente debido al efecto de inhibición por contacto verificado en las células en adherencia, como se mencionó previamente. En tanto en el cultivo en adherencia se obtuvo el valor más bajo de ICV ($3,5 \times 10^7$ cél. h ml⁻¹), el

cultivo en suspensión presentó un valor aproximadamente 10 veces superior ($2,03 \times 10^8$ cél. h ml⁻¹). En los cultivos sin adición de SFB tanto los valores de μ como las concentraciones celulares máximas alcanzadas resultaron muy similares para ambos sistemas, lo que apoyaría la teoría de la limitación del crecimiento asociada a la superficie disponible.

En los cultivos en suspensión con 0,005% y 0% de SFB se verificó una breve fase estacionaria de crecimiento seguida de una fase de muerte celular, mientras que en los cultivos adherentes sólo se evidenció una desaceleración del crecimiento al final de los mismos. El sistema de cultivo no afectó las velocidades de crecimiento, ya que éstas fueron en general similares (con excepción del cultivo adherente al 1% SFB), pero sí la densidad celular máxima alcanzada. Siendo las velocidades específicas de crecimiento similares, la diferencia en las curvas podría estar asociada a un conjunto de eventos que individualmente no tendrían un efecto significativo (menor tensión de DO en los cultivos en *spinner*, estrés por agitación, etc.).

Consumo de glucosa y producción de lactato:

Los cultivos en suspensión mostraron perfiles coincidentes en términos del consumo de glucosa, con una desaceleración en la q_{glc} al final del cultivo, asociada a la desaceleración del crecimiento. Este último fenómeno podría deberse a la acumulación de algún metabolito tóxico en el sobrenadante (y en consecuencia causar la disminución en el consumo de glucosa), o responder directamente a la disminución en la concentración en el azúcar por debajo de un determinado valor (en estos cultivos, alrededor de 10 mM), el cual, sin embargo, está lejos de ser considerado como privación de este azúcar.

En los cultivos adherentes el consumo de glucosa se mantuvo casi constante hasta el último día, a pesar de observarse una caída en la curva de crecimiento celular para las concentraciones de 1% y 0,2% (V/V) SFB. Esta observación podría ser causada por el hecho de que, a pesar de que no se vio aumentado el número de células en estas dos condiciones (1% y 0,2% (V/V) SFB), las células se encontraban metabólicamente muy activas y continuaban consumiendo glucosa (y produciendo catabolitos) a alta velocidad. Se ha demostrado que cuando las células se mantienen en un estado metabólico muy activo, la vida del cultivo disminuye sustancialmente (Altamirano y col., 2001a).

La cinética de producción de lactato fue significativamente diferente, dependiendo del sistema de cultivo empleado. En los cultivos en *spinner* la producción de lactato se incrementó hasta un valor máximo para luego permanecer constante, coincidiendo con el momento en que se observó la desaceleración en el crecimiento y en el consumo de

glucosa, resultados que coinciden con lo informado por Ozturk y col. (1997). En los cultivos en adherencia, en tanto, la concentración de este ácido orgánico en el sobrenadante se incrementó sostenidamente hasta el fin del cultivo, alcanzando valores superiores (alrededor de 20 mM) a los observados en suspensión.

Bajo determinadas condiciones, se ha verificado que las células CHO son capaces de re-metabolizar el lactato producido –dependiendo de la disponibilidad de glucosa–, aunque su destino metabólico no sería el TCA, sino la formación de acetoína (Altamirano y col., 2006a). La acetoína se generaría como producto de una descarboxilación no oxidativa del piruvato, si bien esta vía alternativa de reutilización del lactato no ha sido aún confirmada. La re-metabolización del lactato podría, por otra parte, contribuir a aumentar la longevidad del cultivo (Altamirano y col., 2004). Los resultados de Ozturk y col. (1992, 1997) mostraron que tanto las células CHO como las NS0 cultivadas en suspensión consumen lactato cuando la concentración de glucosa en el medio es baja, a pesar de que la mayoría de las células de mamífero no crecen en presencia de este metabolito como única fuente de carbono, ya que no son capaces de realizar gluconeogénesis (Neermann y Wagner, 1996; Altamirano y col., 2004). Las alteraciones metabólicas asociadas a la selección que sufren las células durante su adaptación a suspensión –que se verifican, por ejemplo, en el aumento en su productividad, según lo informado por Pereira Bacci y col. (1999)–, podrían ser la causa de las diferencias observadas en las cinéticas de consumo de glucosa y producción de lactato entre los cultivos en adherencia y los cultivos en suspensión.

Consumo de glutamina y producción de glutamato y amonio:

El cultivo en el cual se acumuló una mayor cantidad de amonio en el sobrenadante (aproximadamente 2,5 mM) fue aquél sin adición de SFB, lo que ocurrió tanto en adherencia como en suspensión. Se ha observado que la vida media de la glutamina presente en medios de cultivo sin suero es relativamente superior en comparación al mismo medio adicionado con SFB, probablemente debido a la presencia de glutaminasas en este suplemento (Schneider y col., 1996). Basado en estas observaciones, la mayor acumulación de amonio verificada en el medio SMIF 6 sin adición de suero no se debería a la descomposición (enzimática) extracelular sino metabólica de la glutamina. En forma análoga, los perfiles de consumo de glutamina y producción de glutamato observados en este medio de cultivo resultaron similares en ambos sistemas de cultivo.

Por otro lado, aquellos cultivos en medio conteniendo SFB presentaron comportamientos diferentes, dependiendo del sistema de cultivo empleado. Mientras que en adherencia se verificó una mayor variabilidad en las cinéticas de consumo de glutamina y

producción de glutamato y amonio, en suspensión estos cultivos mostraron patrones muy similares entre sí. Este fenómeno, previamente observado, resulta mucho más marcado en este caso, como se desprende de la gran variabilidad observada en q_{am} . La velocidad específica de producción de este metabolito fue muy dispar, verificándose un fenómeno análogo al observado previamente para la producción de lactato: en los cultivos en suspensión el amonio se acumuló sostenidamente en tanto el crecimiento celular era máximo, para luego estabilizarse alrededor de un valor relativamente constante. Una posible explicación sería la utilización del amonio en la síntesis de aminoácidos como la alanina y el aspartato – como un mecanismo de detoxificación –, o de otras especies nitrogenadas que podrían haber sido depletadas del medio de cultivo. En los cultivos en adherencia, sin embargo, la concentración de amonio continuó incrementándose hasta el final del cultivo.

Producción de rhEPO:

Considerando las concentraciones finales de rhEPO, se verificó una gran variabilidad entre los valores obtenidos en los cultivos en adherencia, al compararlos con aquéllos en suspensión. A pesar de que los cultivos adherentes con bajo o nulo contenido de suero alcanzaron concentraciones celulares similares a las obtenidas en suspensión en los mismos medios, se observó que la concentración final de rhEPO fue poco más de un tercio de la obtenida en *spinners*, lo que concuerda con resultados reportados previamente (Pereira Bacci y col., 1999). En todos los casos, y a pesar de los diferentes valores de q_{rhEPO} , la producción de esta glicoproteína se mantuvo prácticamente constante a lo largo de todo el cultivo, en forma independiente a las diferentes fases observadas en la curva de crecimiento. Un comportamiento similar fue observado para la producción de t-PA en células CHO, en cultivos de perfusión semicontinua (Altamirano y col., 2001a) y la producción de anticuerpos monoclonales en cultivos en modo *batch* (Renard y col., 1988).

Posteriormente se realizó el análisis del patrón de isoformas por IEF seguido de *Western blot* frente al estándar de rhEPO. Debido a la escasa cantidad de proteína recombinante recuperada de los cultivos en adherencia se sembraron solamente 0,25 μ g de rhEPO por carril. Dado que la concentración acumulada de rhEPO fue muy baja en el cultivo en adherencia del clon C4H8 en medio SMIF 6 al 1% (V/V) SFB, no fue posible incluir esta muestra en el análisis. Se sembró una masa de 0,35 μ g de rhEPO por carril para aquellas muestras correspondientes al sobrenadante de los cultivos en suspensión. Luego de la reacción inmunoquímica, las bandas fueron densitometradas con el objetivo de establecer la proporción relativa de cada isoforma producida en la mezcla presente en el sobrenadante de cultivo (Tabla XXIV).

Tabla XXIV: Proporción relativa de las isoformas* producidas por el clon C4H8c en medio SMIF 6 adicionado de diferentes concentraciones de SFB.

Isoforma	Adherencia			Suspensión			
	sin SFB	0,005% SFB	0,2% SFB	sin SFB	0,005% SFB	0,2% SFB	1% SFB
-3	2,6%	5,9%	10,5%	12,2%	7,0%	2,3%	9,2%
-2	7,7%	6,9%	10,7%	8,8%	9,0%	8,2%	9,5%
-1	13,0%	11,3%	10,6%	9,5%	11,5%	10,8%	13,2%
0	15,5%	14,2%	9,9%	10,7%	13,7%	12,1%	12,9%
1	15,3%	13,4%	12,9%	10,0%	12,3%	12,1%	11,2%
2	12,2%	12,1%	11,6%	10,3%	12,1%	11,9%	11,8%
3	11,1%	11,5%	11,3%	13,2%	11,9%	8,6%	11,7%
4	8,8%	11,1%	10,2%	10,3%	9,0%	11,6%	8,9%
5	11,3%	10,9%	10,1%	10,1%	9,1%	12,2%	7,0%
6	2,4%	2,7%	2,2%	4,7%	4,4%	8,0%	4,0%
7	ND	ND	ND	0,3%	0,04%	2,0%	0,6%
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* Las isoformas de rhEPO se identificaron de acuerdo con la European Pharmacopoeia (2007), que asigna el número 8 a la isoforma conteniendo 14 moléculas de ácido siálico.

Las muestras correspondientes a los distintos cultivos en adherencia analizados presentaron patrones similares de isoformas durante el análisis por densitometría. Se observó el mismo número de isoformas en todos los casos, las cuales se presentaron con una distribución relativa uniforme entre las muestras. Estas observaciones sugieren que no existirían diferencias significativas entre las isoformas producidas en los cultivos en adherencia, ya que no se verificaron tendencias de aparición/desaparición de determinadas isoformas en función de la cantidad de suero adicionada al medio.

Los cuatro cultivos en suspensión mostraron patrones de glicosilación muy similares entre sí, observándose las mismas glicofomas. Solamente el cultivo en medio adicionado de 0,2% SFB mostró una mayor proporción relativa de isoformas de mayor contenido de ácido siálico, pero dado que no se observó una tendencia a incrementarse el contenido de estas isoformas en la medida en que aumentaba el contenido de suero en el medio de cultivo – ni en los cultivos en adherencia ni en los en suspensión –, no puede considerarse que la adición de suero al medio SMIF 6 mejore significativamente el perfil de isoformas obtenido.

En particular, y debido a que se está evaluando un medio de cultivo alternativo que no requiera de la adición de SFB, estos resultados apoyan la hipótesis de que el medio libre de proteínas SMIF 6 es un medio apropiado para ser empleado en la producción de rhEPO.

4.4.8.4. Evaluación del crecimiento en suspensión y la productividad de los clones B1A2, C4H8c y C4H8d en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB

Se procedió entonces a comparar el crecimiento y metabolismo de los clones B1A2, C4H8d y C4H8c adaptados a suspensión en medio MCE al 0,2 % (V/V) SFB. Para ello se iniciaron tres cultivos en frascos *spinner* de una densidad inicial de aproximadamente 2×10^5 cél. viables ml^{-1} , tomándose una muestra diaria de suspensión. Sobre esta muestra se realizó el recuento de células viables y totales, para luego centrifugar el resto de la suspensión 2 min a 600 *g*. El sobrenadante libre de células se conservó a -20°C , con el fin de determinar posteriormente la concentración de glucosa, lactato, amonio y rHEPO.

Las variaciones en la concentración celular y en la concentración de metabolitos graficadas en función de la ICV se muestran en la Fig. 21.

La Tabla XXV resume los datos de velocidades específicas de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de catabolitos, en tanto los datos de $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ y de $Y_{\text{am}/\text{gln}}$ se muestran en la Tabla XXVI.

Las curvas obtenidas muestran que tanto el clon B1A2 como el C4H8c alcanzaron concentraciones celulares máximas cercanas a 1×10^6 cél. viables ml^{-1} , mientras que el crecimiento del clon C4H8d – adaptado a suspensión siguiendo la metodología de un solo paso – fue más limitado, llegando a una concentración máxima de aproximadamente 50% con respecto a los otros dos cultivos. Si bien la μ asociada al clon C4H8d fue del mismo orden que las velocidades de los otros dos clones, ésta se mantuvo constante por apenas 48 h de cultivo, disminuyendo luego sensiblemente y resultando en una menor densidad celular máxima.

El comportamiento de los clones en términos de q_{glc} fue similar, pero el clon C4H8d mostró un aprovechamiento menos eficiente de glucosa debido a que la velocidad específica de producción de lactato se mantuvo constante por más tiempo, rindiendo así una concentración acumulada de este metabolito aproximadamente 30% más alta.

Los perfiles de consumo de glutamina y producción de glutamato resultaron coincidentes entre los tres clones estudiados. Si bien los valores de q_{am} también fueron muy similares, se verificó una diferencia en la concentración acumulada de amonio, debido a que el tiempo de cultivo durante el cual se mantuvieron constantes estas velocidades específicas fue diferente para cada clon.

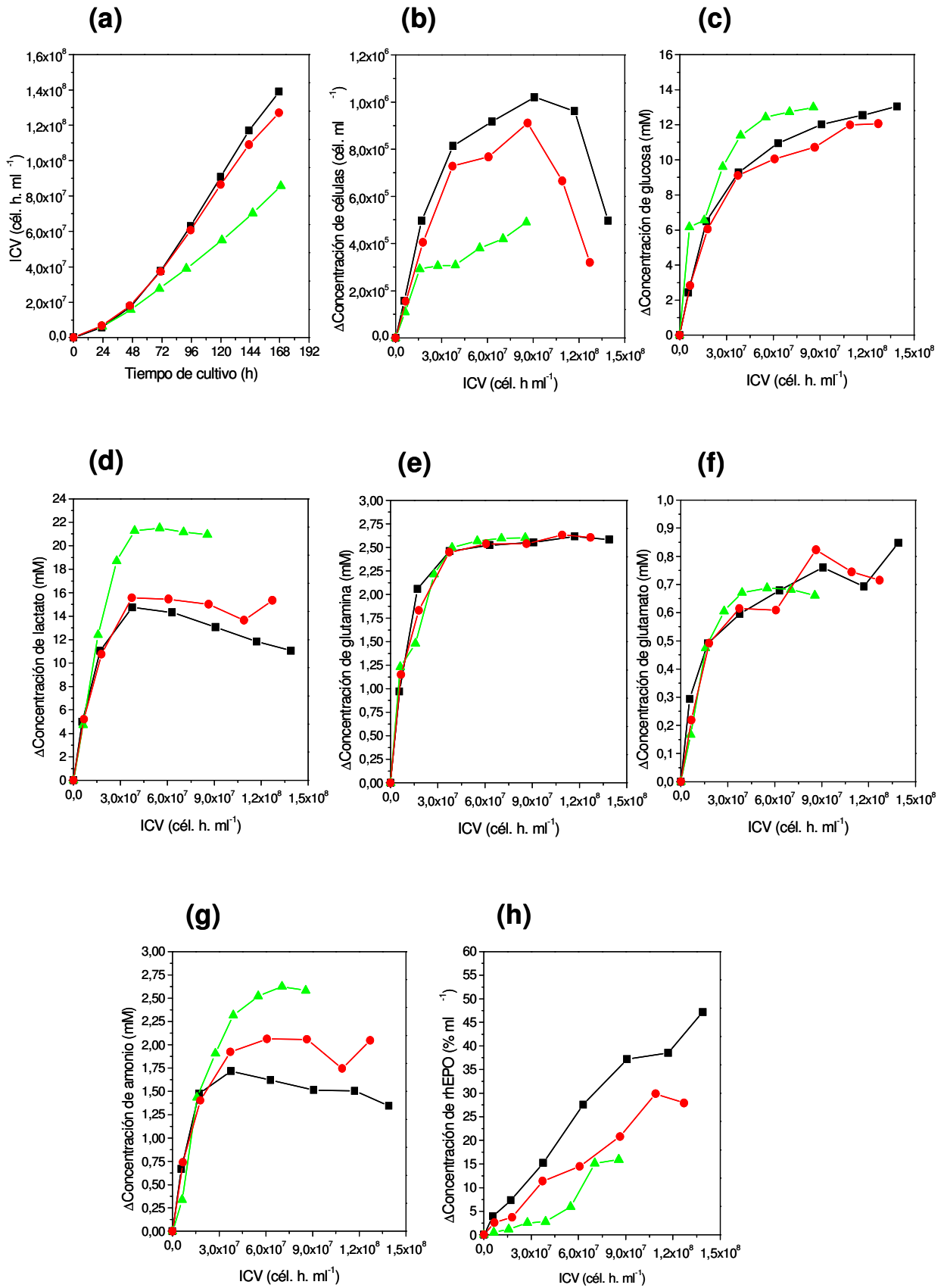


Fig. 21: Curvas de (a) ICV, (b) células, (c) glucosa, (d) lactato, (e) glutamina, (f) glutamato, (g) amonio y (h) rhEPO para los cultivos en suspensión en medio MCE 0,2% SFB de (■) clon B1A2, (●) clon C4H8c y (▲) clon C4H8d.

Con referencia a la producción amonio, la concentración máxima alcanzada en el sobrenadante de los clones se obtuvo en el orden C4H8d>C4H8c>B1A2. La producción volumétrica de este metabolito fue 52% y 18% superior para los clones C4H8d y C4H8c, respectivamente, comparados con el clon B1A2. Tanto el clon C4H8c como el clon C4H8d, adaptados a suspensión a partir del mismo clon original C4H8, presentaron así un metabolismo menos eficiente en comparación con el clon B1A2, adaptado de igual manera que el C4H8c, pero proveniente de una línea celular CHO-rhEPO diferente. Además de esta diferencia asociada al origen de las células, se observó asimismo que la metodología de adaptación a suspensión también tiene un efecto significativo sobre el comportamiento metabólico, lo que ha sido previamente reportado para otra línea de células CHO (Bollati Fogolín, 2002).

Los valores de q_{rhEPO} , así como los otros parámetros evaluados, también difirieron entre los clones, observándose la mayor productividad de rhEPO – tanto específica como volumétrica – para el clon B1A2. También en esta variable se verificaron diferencias entre los dos clones provenientes de la línea P2C4: el clon C4H8d presentó una velocidad específica de producción de la hormona inferior a la de su par C4H8c.

Tabla XXV: Parámetros metabólicos específicos para los clones B1A2, C4H8c y C4H8d cultivados en suspensión en medio MCE 0,2% (V/V) SFB.

Parámetro	B1A2	C4H8c	C4H8d
μ (h^{-1})	0,022±0,003 <i>R=0,99</i> <i>P=0,014</i>	0,019±0,001 <i>R=0,99</i> <i>P=0,003</i>	0,0187±0,0004 <i>R=0,99</i> <i>P=0,014</i>
q_{glc}^{glc} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	376±19 <i>R=0,99</i> <i>P=0,032</i>	333±38 <i>R=0,99</i> <i>P=0,072</i>	300±106 <i>R=0,90</i> <i>P=0,105</i>
q_{lac}^{lac} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	629±85 <i>R=0,99</i> <i>P=0,086</i>	588±77 <i>R=0,99</i> <i>P=0,083</i>	684±49 <i>R=0,99</i> <i>P=0,005</i>
q_{am}^{am} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	84±11 <i>R=0,99</i> <i>P=0,087</i>	76±14 <i>R=0,98</i> <i>P=0,115</i>	73±11 <i>R=0,98</i> <i>P=0,023</i>
q_{gln}^{gln} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	117±19 <i>R=0,99</i> <i>P=0,101</i>	98±30 <i>R=0,96</i> <i>P=0,189</i>	72±19 <i>R=0,93</i> <i>P=0,066</i>
q_{glu}^{glu} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	27±8 <i>R=0,95</i> <i>P=0,194</i>	27±2 <i>R=0,99</i> <i>P=0,055</i>	30±2 <i>R=0,99</i> <i>P=0,032</i>
q_{rhEPO}^{rhEPO} ($\% \ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	0,336±0,022 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	0,261±0,015 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	0,196±0,029 <i>R=0,94</i> <i>P=0,0006</i>

Tabla XXVI: Valores de $Y_{lac/glc}$ e $Y_{am/gln}$ obtenidos para los clones B1A2, C4H8c y C4H8d cultivados en suspensión en medio MCE 0,2% (V/V) SFB.

Clon	$Y_{lac/glc}$	$Y_{am/gln}$
B1A2	1,7±0,2	0,7±0,1
C4H8c	1,8±0,3	0,8±0,3
C4H8d	2,3±0,8	1,0±0,3

4.4.8.5. Evaluación del crecimiento en suspensión y la productividad de los clones B1A2, C4H8c y C4H8d en medio SMIF 6

En forma análoga a la descrita previamente, se estudió el crecimiento de los clones B1A2 y C4H8d cuando éstos eran cultivados en suspensión en medio SMIF 6. Con fines comparativos se incluyen los datos obtenidos para el cultivo del clon C4H8c cultivado en suspensión en este mismo medio, durante la experiencia descrita en el apartado 4.4.8.1.

Para ello se iniciaron dos cultivos en suspensión a partir de un cultivo madre de cada clon, con una densidad inicial de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1} , los cuales fueron monitoreados en términos de concentración de células viables y nutrientes.

En la Fig. 22 se encuentran graficados los datos de concentración de células viables, glucosa, lactato, glutamina, glutamato, amonio y rhEPO versus la ICV. Los valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} obtenidos a partir de estas gráficas se resumen en la Tabla XXVII, mientras que los datos de $Y_{lac/glc}$ y de $Y_{am/gln}$ se presentan en la Tabla XXVIII. Tanto en las gráficas como en las tablas se mencionan también los datos obtenidos previamente para el clon C4H8c.

Puede observarse que los resultados obtenidos en medio SMIF 6 son, en términos generales, similares a los obtenidos en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB. La velocidad de crecimiento determinada para los clones evaluados coincide aproximadamente para la reportada por Scharfenberg y Wagner en su estudio ya mencionado ($\mu \approx 0,015$, correspondiente a un tiempo de duplicación de aproximadamente 48 h).

El clon B1A2 presenta los mejores perfiles de crecimiento y productividad: si bien las velocidades específicas de consumo de glucosa y glutamina, así como de producción de lactato, glutamato y amonio son similares para los tres clones, se observan diferencias significativas en las curvas de crecimiento y de producción de rhEPO. En medio SMIF 6 el clon B1A2 mostró un crecimiento superior al observado en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB, alcanzando una concentración celular aproximadamente 50% más alta en el primero.

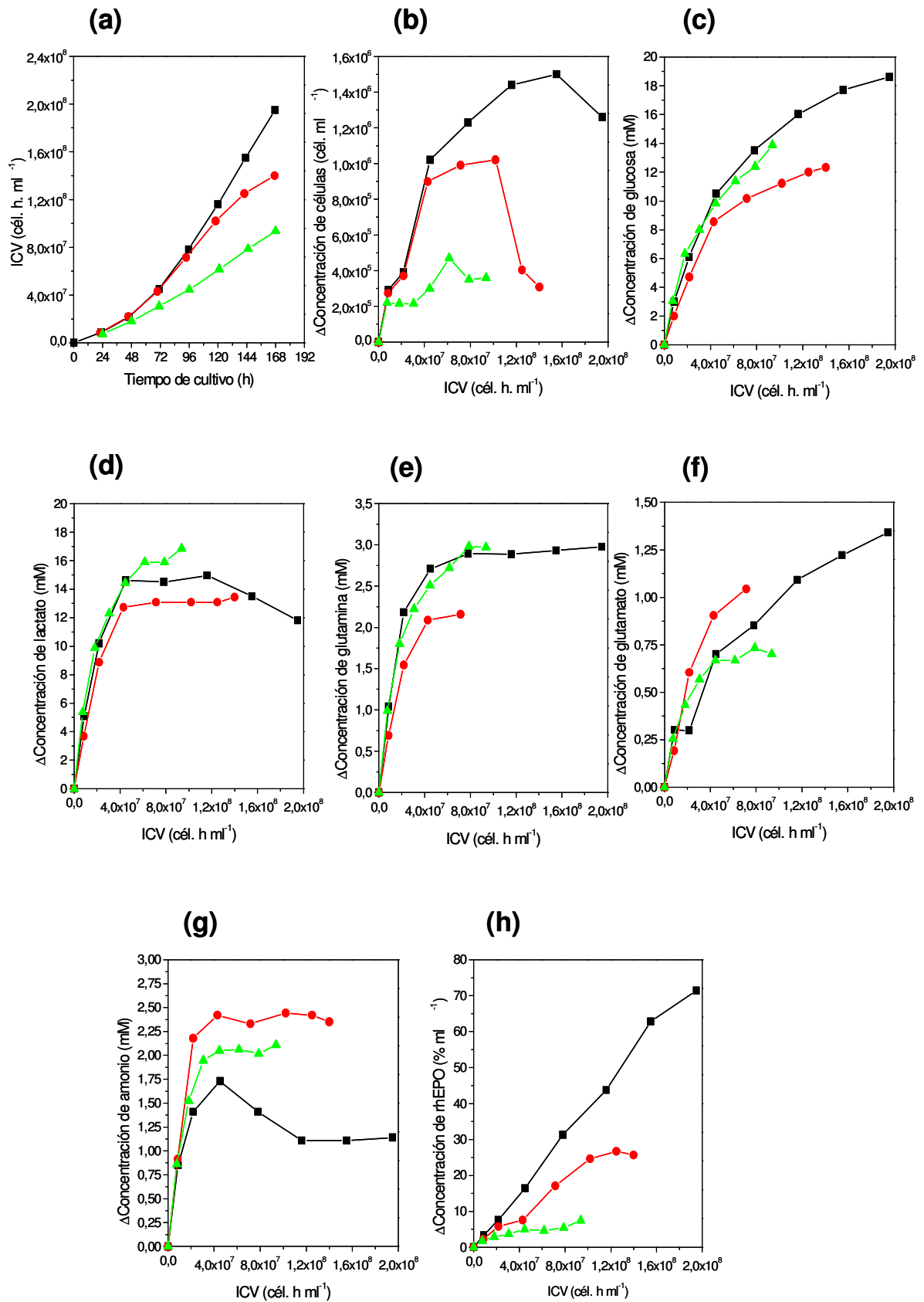


Fig. 22: Curvas de (a) ICV, (b) células, (c) glucosa, (d) lactato, (e) glutamina, (f) glutamato, (g) amonio y (h) rhEPO para los cultivos en suspensión en medio SMIF 6 de (■) clon B1A2, (●) clon C4H8c y (▲) clon C4H8d.

La concentración de proteína recombinante acumulada en el sobrenadante de cultivo del clon B1A2 fue más de un 20% superior a la obtenida en medio de cultivo tradicional. Paralelamente se observó que en el cultivo en suspensión del clon C4H8d en el medio libre de proteínas, la acumulación de esta proteína fue levemente menor a la obtenida en la experiencia anterior. Esto indicaría una relación directa del clon con el medio de cultivo empleado: si bien existen medios más complejos unos que otros – los cuales pueden ser más favorables para el crecimiento de una u otra línea celular –, el efecto directo de un medio de cultivo particular sobre el clon de trabajo debe ser determinado en cada caso.

Tabla XXVII: Parámetros metabólicos específicos para los clones B1A2, C4H8c y C4H8d cultivados en suspensión en medio SMIF 6.

Parámetro	B1A2	C4H8c	C4H8d
μ (h^{-1})	0,022±0,003 <i>R=0,98</i> <i>P=0,017</i>	0,020±0,003 <i>R=0,95</i> <i>P=0,0003</i>	0,011±0,008 <i>R=0,80</i> <i>P=0,410</i>
q_{glc} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	227±21 <i>R=0,99</i> <i>P=0,008</i>	198±8 <i>R=0,99</i> <i>P=0,0001</i>	260±43 <i>R=0,97</i> <i>P=0,026</i>
q_{lac} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	463±55 <i>R=0,99</i> <i>P=0,075</i>	293±43 <i>R=0,98</i> <i>P=0,018</i>	537±83 <i>R=0,99</i> <i>P=0,097</i>
q_{am} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	63±15 <i>R=0,97</i> <i>P=0,151</i>	99±4 <i>R=0,99</i> <i>P=0,001</i>	83±15 <i>R=0,98</i> <i>P=0,112</i>
q_{gln} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	99±9 <i>R=0,99</i> <i>P=0,059</i>	48±9 <i>R=0,98</i> <i>P=0,0021</i>	71±14 <i>R=0,96</i> <i>P=0,038</i>
q_{glu} ($nmol\ 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	14±3 <i>R=0,95</i> <i>P=0,046</i>	21±3 <i>R=0,99</i> <i>P=0,024</i>	23±5 <i>R=0,98</i> <i>P=0,128</i>
q_{rhEPO} ($\% 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)	0,381±0,011 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	0,237±0,015 <i>R=0,97</i> <i>P=0,011</i>	0,064±0,009 <i>R=0,95</i> <i>P=0,0003</i>

Tabla XXVIII: Valores de $Y_{lac/glc}$ e $Y_{am/gln}$ obtenidos para los clones B1A2, C4H8c y C4H8d cultivados en suspensión en medio SMIF 6.

Clon	$Y_{lac/glc}$	$Y_{am/gln}$
B1A2	2,0±0,3	0,6±0,2
C4H8c	1,5±0,2	2,1±0,4
C4H8d	2,1±0,5	1,2±0,3

Se realizó luego el análisis de las isoformas producidas en los cultivos en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB (descrita en la sección anterior) y en medio SMIF 6. Debido a la baja productividad de rhEPO del clon C4H8d cuando éste fue cultivado en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB, no fue posible incluir esta muestra en el análisis.

Tal como puede observarse en la Tabla XXIX, el patrón de glicosilación con mayor contenido de moléculas altamente sializadas se obtiene con el clon B1A2, ya sea que se lo cultive en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB o en medio SMIF 6. El clon C4H8c mostró, sin embargo, diferencias en el perfil de isoformas producidas asociadas al medio de cultivo empleado: en tanto en medio SMIF 6 se obtuvieron las mismas glicofomas producidas por el clon B1A2, en una proporción semejante a éste, en medio MCE se observó la desaparición de la glicofoma más ácida. Esta glicofoma está ausente también en el *pool* de moléculas producidas por el clon C4H8d, en medio SMIF 6.

El hecho de que el clon C4H8d presentara en medio SMIF 6 un patrón en el cual no se observa la isoforma de mayor contenido de ácido siálico, sumado a la baja productividad de rhEPO en medio MCE al 0,2 (V/V) SFB, lo descalifica para la continuación de su estudio.

Tabla XXIX: Proporción relativa de las isoformas de la molécula de rhEPO producida por los clones B1A2, C4H8c y C4H8d cuando fueron cultivados en suspensión en los medios MCE 0,2% (V/V) SFB y SMIF 6.

Isoforma	Clon B1A2		Clon C4H8c		Clon C4H8d SMIF 6
	MCE 0,2% SFB	SMIF 6	MCE 0,2% SFB	SMIF 6	
-3	10,4%	12,8%	4,2%	12,2%	9,4%
-2	7,5%	12,8%	11,0%	8,8%	11,2%
-1	11,3%	9,2%	16,5%	9,5%	14,5%
0	10,7%	10,4%	17,9%	10,7%	15,1%
1	13,0%	11,3%	16,9%	10,0%	13,5%
2	12,1% ³	10,8%	11,2%	10,3%	11,7%
3	12,3%	9,7%	7,8%	13,2%	10,4%
4	12,8%	8,7%	7,2%	10,3%	6,9%
5	9,3%	9,0%	6,8%	10,1%	6,7%
6	0,5%	4,1%	0,6%	4,7%	0,7%
7	0,02%	1,2%	ND	0,3%	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND

Los resultados obtenidos en estas experiencias indican que el clon B1A2 es el que mejor responde a las características requeridas, mostrando la mejor adaptación y

crecimiento tanto en un medio tradicional adicionado de suero como en un medio libre de proteínas. La velocidad de crecimiento, la densidad celular alcanzada, los perfiles de consumo de nutrientes y producción de catabolitos, así como la productividad y calidad glicosídica de la molécula de rhEPO producida en el cultivo de este clon lo convierten en el más adecuado para continuar con su estudio en las próximas etapas de este trabajo.

4.5. CONCLUSIONES

- Se clonaron 10 líneas celulares productoras de rhEPO, seleccionándose los clones B1A2, B1D8, C4B3, C4D8, C4H8, B2H5 y B4H5 en base a su productividad.
- Los clones B1A2 y C4H8 presentaron un perfil de glicosilación con alto contenido de isoformas ácidas y una alta q_{rhEPO} , alcanzando densidades celulares satisfactorias. Ambos mostraron una baja velocidad de producción de amonio y una buena relación $Y_{lac/glc}$, particularmente el clon B1A2. Por estas razones se decidió continuar el proceso de adaptación al crecimiento en suspensión de estos dos clones.
- Se determinó que el medio MCE-AGG puede ser sustituido por el medio MCE durante la producción de rhEPO sin que se verificasen alteraciones en el crecimiento o en la productividad celular.
- Durante la adaptación progresiva del clon B1A2 al crecimiento en suspensión en medio MCE se determinó que la concentración mínima de SFB requerida para mantener un crecimiento y metabolismo normales cuando éste es cultivado en MCE es de 0,2% (V/V), y en estas condiciones fue posible obtener altas concentraciones celulares, del orden de 1×10^6 cél. viables ml^{-1} .
- Fue posible mantener una alta viabilidad en cultivos del clon B1A2 en MCE al 0,1% (V/V) SFB, si bien la velocidad de crecimiento se vio reducida. Esta reducción hace inviable el uso de estas condiciones de cultivo cuando se requiere obtener altas concentraciones celulares en corto tiempo, pero puede ser empleada en aquellas etapas del proceso en las que se prioriza la productividad por sobre el crecimiento.
- Una concentración de SFB de 0,04% (V/V) provocó alteraciones en la morfología celular del clon B1A2; las células que permanecieron adheridas incrementaron su longitud respecto del diámetro y, aunque mantuvieron su viabilidad, la velocidad de crecimiento fue casi nula.
- El proceso de adaptación del clon B1A2 al crecimiento en suspensión en el medio libre de proteínas SMIF 6 fue exitoso, lo que constituye un hecho de gran interés desde el punto

de vista tecnológico, por la necesidad de contar con procesos productivos que utilicen medios de cultivo libres de suero. La concentración máxima de células alcanzada fue de $9,1 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1} .

- El número de células que permanecieron adheridas al frasco de cultivo de este clon luego del reemplazo total del sobrenadante por medio SMIF 6 fue muy inferior al obtenido en el caso de la adaptación de este clon al crecimiento en adherencia en MCE, por lo que se requeriría un estudio más completo con el fin de establecer la capacidad de estas células de proliferar en estas condiciones de adherencia.
- Durante el proceso de adaptación progresiva del clon C4H8 al crecimiento en suspensión en medio MCE se determinó que una concentración mínima de SFB de 0,2% (V/V) permite mantener las células en crecimiento normal en adherencia, y si bien una concentración de 0,1% (V/V) fue suficiente para mantener la viabilidad del cultivo, la velocidad de crecimiento se vio drásticamente reducida.
- El clon C4H8 mostró un crecimiento completamente normal cuando se lo cultivó en suspensión en MCE al 0,2% (V/V) SFB, en términos del tiempo de duplicación y de concentración celular alcanzada ($8,9 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1}).
- Este clon demostró, además, ser capaz de crecer en MCE sin el agregado de SFB, a través de sucesivos subcultivos, aunque la velocidad de crecimiento y la densidad celular máxima ($5,4 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1}) fueron inferiores a los presentados por el cultivo al 0,2% (V/V) SFB.
- El clon C4H8 fue adaptado exitosamente al crecimiento en suspensión en el medio SMIF 6, en solamente tres semanas, verificándose un crecimiento y tiempo de duplicación normales, así como una alta concentración de células viables ($1,2 \times 10^6$ cél. viables ml^{-1}), hechos que satisfacen los requerimientos del escalamiento del proceso productivo.
- De igual manera a lo observado previamente para el clon B1A2, el medio SMIF 6 no favoreció el desarrollo del clon C4H8 en adherencia.
- Con referencia al efecto del agregado de suero al medio de cultivo SMIF 6, la influencia de este factor dependió en gran medida del sistema de cultivo empleado.
- En los cultivos adherentes se observó un efecto muy significativo de la concentración de suero: aquellos cultivos con menor concentración de SFB (0,005% y 0%) presentaron valores de μ inferiores a los observados con 0,2% y 1% de SFB, pero estas velocidades se mantuvieron constantes durante más tiempo, obteniéndose así concentraciones celulares máximas y valores de ICV sustancialmente más altos.

- En estos cultivos, a mayor contenido de SFB en el medio, menores fueron los valores obtenidos de q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} .
- Con respecto al estudio del efecto del sistema de cultivo sobre el metabolismo celular, en los cultivos en suspensión se observó en general una menor variabilidad en los perfiles metabólicos obtenidos – es decir, un menor efecto del suero sobre ellos – que en los cultivos adherentes, en donde este efecto fue mucho más significativo. Probablemente este último hecho esté relacionado con las grandes diferencias observadas en el crecimiento de las células cuando éstas fueron cultivadas en placa, a las distintas concentraciones de suero, y las densidades celulares alcanzadas en cada condición estudiada (1%, 0,2%, 0,005% y medio sin SFB). Las alteraciones metabólicas asociadas a la selección que sufren las células durante su adaptación a suspensión podrían ser la causa del comportamiento diferenciado de las células cuando éstas crecen en distintos sistemas de cultivo.
- En particular, los cultivos en medio SMIF 6 sin SFB, tanto en placa como en *spinner*, mostraron comportamientos muy similares, con la excepción de la concentración final de rhEPO alcanzada.
- En suspensión se obtuvieron concentraciones de rhEPO significativamente más altas que en adherencia, aún cuando se alcanzaron concentraciones celulares iguales, como ocurrió en el cultivo en medio sin suero.
- Los valores más altos de q_{rhEPO} se obtuvieron en los cultivos en SMIF 6 sin adición de SFB, tanto en los cultivos en adherencia como en los de suspensión.
- Independientemente del sistema de cultivo empleado, el SFB no tiene un efecto cuantificable sobre el consumo de glucosa y la producción de lactato, pero sí sobre la producción de amonio, ya que cuando aquél no se adiciona al medio SMIF 6 se acumulan altas concentraciones de este metabolito en el sobrenadante de cultivo.
- Tanto en los cultivos en adherencia como en los cultivos en suspensión, no se observaron indicios de que la presencia de SFB ejerza algún efecto sobre la calidad glicosídica de la molécula de rhEPO producida, cuando el clon C4H8 es cultivado en medio SMIF 6.
- El medio de cultivo SMIF 6 es un medio que aporta los nutrientes requeridos por los clones estudiados en calidad y cantidad suficientes para sostener el crecimiento y generar un patrón de isoformas apropiados para su utilización en el proceso productivo de rhEPO, sin que su *performance* se vea mejorada por la presencia de suero.
- El clon B1A2 mostró la mejor relación de parámetros metabólicos con respecto a los

clones C4H8c y C4H8d, todos ellos cultivados en suspensión en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB. La velocidad específica de crecimiento fue normal y comparable a aquella obtenida con porcentajes mayores de suero, permitiendo que el cultivo alcanzase una densidad celular máxima superior a 1×10^6 cél. viables ml^{-1} .

- El clon C4H8c, adaptado al crecimiento en suspensión siguiendo la misma metodología que el clon B1A2, tuvo en líneas generales un comportamiento similar al del clon B1A2, con la excepción de la producción de rhEPO, inferior a este último.
- El clon C4H8d – adaptado al crecimiento en suspensión por el método de un único paso –, por el contrario, presentó un crecimiento muy limitado. Este hecho podría deberse a un efecto perjudicial provocado por un cambio drástico en el entorno celular durante la adaptación, o a la selección de un clon particular dentro de la población de células.
- El clon B1A2, cultivado en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB, resultó el mejor de los tres clones estudiados, tanto desde el punto de vista de su crecimiento como de su productividad.
- En forma análoga, el clon B1A2 presentó el mejor perfil de crecimiento y productividad, comparado con los clones C4H8c y C4H8d, cuando fueron cultivados en medio SMIF 6.
- Este clon tiene una *performance* superior cuando es cultivado en medio SMIF 6, al compararlo con los datos obtenidos en medio MCE al 0,2% (V/V) SFB.
- El clon C4H8c produce una proporción relativa de isoformas diferente según se lo cultivo en uno u otro medio. En medio MCE al 0,2% (V/V) SFB deja de observarse la isoforma de mayor contenido de ácido siálico.
- El perfil de glicofomas producidas por el clon B1A2 no presenta variaciones significativas entre los dos medios de cultivo estudiados, siendo además el clon que presenta el mejor conjunto de isoformas y parámetros metabólicos, razones por las cuales se lo eligió como clon productor de rhEPO y fue utilizado en experiencias posteriores.

5-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

CAPÍTULO 2

5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL AGREGADO AL MEDIO DE CULTIVO DE DIFERENTES COMPONENTES SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD DEL CLON B1A2

5.1. OBJETIVOS

En esta sección se presentan las experiencias realizadas tendientes a:

- Estudiar el efecto de la adición de los aminoazúcares N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y N-acetil-D-manosamina (ManNAc) al medio de cultivo SMIF 6, sobre el crecimiento, productividad y perfil de glicoformas rhEPO producidas por el clon B1A2.
- Estudiar el proceso de descomposición térmica de la glutamina y la consecuente generación de amonio en el medio de cultivo conservado en distintas condiciones de temperatura y pH.
- Estudiar el efecto de diferentes niveles del ion amonio en el medio de cultivo sobre el crecimiento, productividad y perfil de glicoformas rhEPO producidas por el clon B1A2.
- Estudiar el efecto del uso de medios de cultivo hiper e hiposmolales sobre el crecimiento, productividad y perfil de glicoformas rhEPO producidas por el clon B1A2.
- Estudiar el efecto combinado de la baja osmolalidad del medio de cultivo suplementado con diferentes mezclas de hexosas sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2.

5.2. INTRODUCCIÓN

Como se ha destacado anteriormente, la glutamina es un componente de gran importancia en los medios de cultivo de las LCCm, debido a que de ella se deriva la mayor parte de la energía celular y por ser precursora directa de la generación de amonio, tanto intra como extracelularmente.

Cuando el objetivo de un trabajo experimental está relacionado con procesos tan influenciados como por ejemplo el proceso de glicosilación, deben tomarse algunos recaudos adicionales a la práctica estándar del cultivo de células animales. En particular, el tratamiento dado a la conservación del medio de cultivo es crítico (Trisch y Moore, 1962). Si el medio de cultivo que se desea utilizar no ha sido apropiadamente tratado (por ejemplo, colocándolo repetidamente en la estufa de cultivo para llevarlo a la temperatura de trabajo, una práctica común en algunos laboratorios) puede con el tiempo acumularse amonio en el mismo, a partir de la descomposición de la glutamina, entre otros efectos perjudiciales.

El amoníaco es una molécula pequeña, no cargada y lipofílica; el pequeño porcentaje de NH_3 presente en las fases acuosas intra y extracelular (1% de la concentración total de NH_3 y NH_4^+ a pH fisiológico 7,1-7,5) difunde libremente a través de la membrana equilibrando las concentraciones a ambos lados. La protonación del NH_3 para formar NH_4^+ es extremadamente rápida, y ambas especies se encuentran siempre en equilibrio.

La generación extracelular de amonio derivada de la descomposición térmica y enzimática (esta última mediada por la glutaminasa presente en el suero) de la glutamina, producirá sobre el metabolismo de las células efectos diferentes a los ocasionados por la producción intracelular de este ion, esencialmente debido a fenómenos de transporte:

- El amonio presente en el medio extracelular (ya sea generado por descomposición de la glutamina o adicionado en forma exógena) ingresa a la célula fundamentalmente mediante un transporte activo, debido a su carga, en tanto que el amoníaco extracelular difunde pasivamente a través de la membrana plasmática, restableciéndose el equilibrio entre ambos compuestos. Una vez en el citoplasma, el amoníaco difunde e ingresa a las diferentes organelas, dentro las cuales captará protones para formar NH_4^+ , *alcalinizando* el interior de aquéllas. Cuando esto ocurre en un compartimiento ácido como los lisosomas o el trans-Golgi, la funcionalidad de estas organelas se ve seriamente comprometida.
- El amonio generado en el interior de la mitocondria como consecuencia de la desaminación de la glutamina, por el contrario, se equilibra con su forma no protonada, NH_3 , liberando H^+ en el interior de esta organela, los cuales quedan retenidos en este compartimiento debido a la extrema impermeabilidad de la membrana interna de la mitocondria al pasaje de iones (Schneider y col., 1996). El NH_3 difunde hacia el citoplasma y consecuentemente el equilibrio se desplaza hacia la formación de amoníaco, generándose cada vez más protones y *acidificando* el espacio intramitocondrial.

Como se ve, el efecto del amonio sobre el metabolismo de las células desde el punto de vista de la variación del pH intracelular es completamente diferente dependiendo del lugar de origen del NH_4^+ : el agregado de amonio al medio extracelular provoca un incremento en el pH interno de la mitocondria, en tanto que la generación intramitocondrial de amonio provoca una acidificación de esta organela (Schneider y col., 1996). Por esta razón no es correcto extrapolar los resultados obtenidos cuando el medio de cultivo contiene inicialmente una alta concentración de amonio, al proceso de acumulación en el medio de cultivo de amonio producido intracelularmente como resultado del metabolismo de las

células, y liberado al sobrenadante de cultivo.

Mediante la realización de experimentos en los que se adicionó amonio marcado radioactivamente al medio de cultivo, Valley y col. (1999) determinaron que entre el 60% y el 80% del nitrógeno presente en los oligosacáridos provenía del aporte exógeno de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. El mismo grupo de trabajo verificó además que la adición de NH_4Cl al cultivo de células mamífero induce el incremento de la concentración intracelular de UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc (Ryll y col., 1994). Ambas moléculas se encuentran en equilibrio en el medio intracelular y constituyen el denominado *pool de azúcar-nucleótidos* o UDP-GNAc. En las células eucariotas, los azúcar-nucleótidos actúan como donores para los procesos de glicosilación de proteínas y lípidos (Boehmelt y col., 2000). En particular, cumplen un rol fundamental en la síntesis de glicoproteínas, ya que son precursores de la síntesis de ácido siálico (NeuNAc). En 1995, Pels Rijcken y col. propusieron el siguiente mecanismo de acción para la alteración de la glicosilación como consecuencia de la variación en los niveles de azúcares activados (Fig. 23):

La fructosa-6-fosfato (Frc-6-P) que proviene de la glicólisis es aminada, incorporando amonio, para transformarse en glucosamina-6-P (GlcN-6-P). La GlcN-6-P es acetilada por la GlcN-6-P acetilasa para generar GlcNAc-6-P, la cual a su vez se convierte en GlcNAc-1-P por la acción de la acetilglucosamina fosfomutasa. Finalmente la GlcNAc-1-P se activa por acción de la UDP-GlcNAc pirofosforilasa a UDP-GlcNAc, la cual se encuentra en equilibrio con la UDP-GalNAc mediante la enzima UDP-N-acetil-D-glucosamina-4-epimerasa.

Altas concentraciones de amonio activan la conversión de la Frc-6-P a GlcN-6-P, lo que finalmente conduce a la acumulación de altas concentraciones de UDP-GNAc. El aumento en el *pool* de azúcar-nucleótidos inhibe a la GlcNAc-6-P sintetasa (GPS), e hipotéticamente aumentaría el flujo de UDP-GNAc hacia el aparato de Golgi (a través del sistema II de transporte de azúcar-nucleótidos, *S-II*), a la vez que inhibiría al sistema I de transporte (*S-I*) de azúcar-nucleótidos por el cual el CMP-NeuNAc ingresa al Golgi. Este último hecho disminuiría la concentración de CMP-NeuNAc en el *trans*-Golgi, y sería una potencial causa de la sialidación incompleta de las glicoproteínas. Se ha postulado además que el aumento en el flujo de UDP-GNAc al Golgi podría aumentar la actividad de alguna enzima del tipo N-acetilglucosaminiltransferasa, que intervenga en los procesos de ramificación de las cadenas de carbohidratos en esta organela.

La biosíntesis de CMP-NeuNAc, por otro lado, depende directamente del contenido de ManNAc y se ve afectada por altas concentraciones del *pool* de UDP-GNAc: inicialmente la UDP-GlcNAc es convertida a ManNAc y N-acetilmanosamina-6-fosfato (ManNAc-6-P) por

un proceso de epimerización y posterior fosforilación catalizadas ambas por la enzima bifuncional UDP-GlcNAc-2-epimerasa/ ManNAc-quinasa. La epimerización es el paso limitante de la biosíntesis del ácido siálico. Luego la ácido siálico sintetasa convierte la ManNAc-6-P en ácido neuramínico-9-fosfato (NeuNAc-9-P) en una reacción de condensación con fosfoenolpiruvato. Después de la defosforilación del NeuNAc-9-P, el NeuNAc es acoplado a CTP por acción de la enzima CMP-NeuNAc sintetasa (localizada en el núcleo) para generar la forma activada del ácido siálico, CMP-NeuNAc. Las moléculas de CMP-NeuNAc así sintetizadas son transportadas al aparato de Golgi a través de un transportador específico y son utilizadas como sustrato de las sialiltransferasas y las polisialiltransferasas para sialidar las glicoproteínas (Shing y col., 2006). Una alta concentración de CMP-NeuNAc, por otra parte, reduce su propia síntesis a través de un *feedback* negativo a nivel de la UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa.

Paralelamente, los iones amonio participan en la formación de carbamifosfato (CP) a nivel de mitocondria, en una reacción catalizada por la carbamifosfato sintetasa. Cuando se alcanzan altas concentraciones de amonio intramitocondrial, el CP pasa al citoplasma y estimula la síntesis *de novo* de UTP, el cual se destina a la activación de los aminoazúcares y contribuye a la depleción de este compuesto energético en el citoplasma.

Las vías de síntesis de UTP, UDP-GNAc y CMP-NeuNAc se esquematizan en la Fig. 23.

El aumento en la concentración intracelular de UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc por efecto del agregado de NH_4Cl al medio de cultivo puede ser simulado también mediante el agregado de glucosamina o galactosamina, moléculas inhibitoras del crecimiento celular (Pels Rijcken y col., 1995; Wagner, 1997; Yang y Butler, 2002). La inhibición del crecimiento celular causada por el agregado de estas especies al medio de cultivo no se debería a la reducción de la disponibilidad de UTP y CMP intracelular ocurrida como consecuencia del incremento en la concentración de UDP-GNAc, como se creyó por mucho tiempo, sino a un efecto específico asociado a la concentración de estos azúcar-nucleótidos (Krug y col., 1984; Grammatikos y col., 1998). Otras posibles alternativas apuntan a una disminución en el transporte de glucosa al interior de la célula, provocada por la inhibición competitiva de la glucosamina, o (menos probablemente) a la acumulación intracelular de amonio debido a la deaminación de la glucosamina catalizada por la GlcN-6-P deaminasa, como causas del retardo observado en el crecimiento celular (Yang y Butler, 2002).

Grammatikos y col. (1998) observaron que la adición tanto de NH_4Cl como de glucosamina al cultivo afecta el proceso de N-glicosilación al favorecer la síntesis de estructuras de mayor antenaridad, probablemente debido a los altos niveles intracelulares

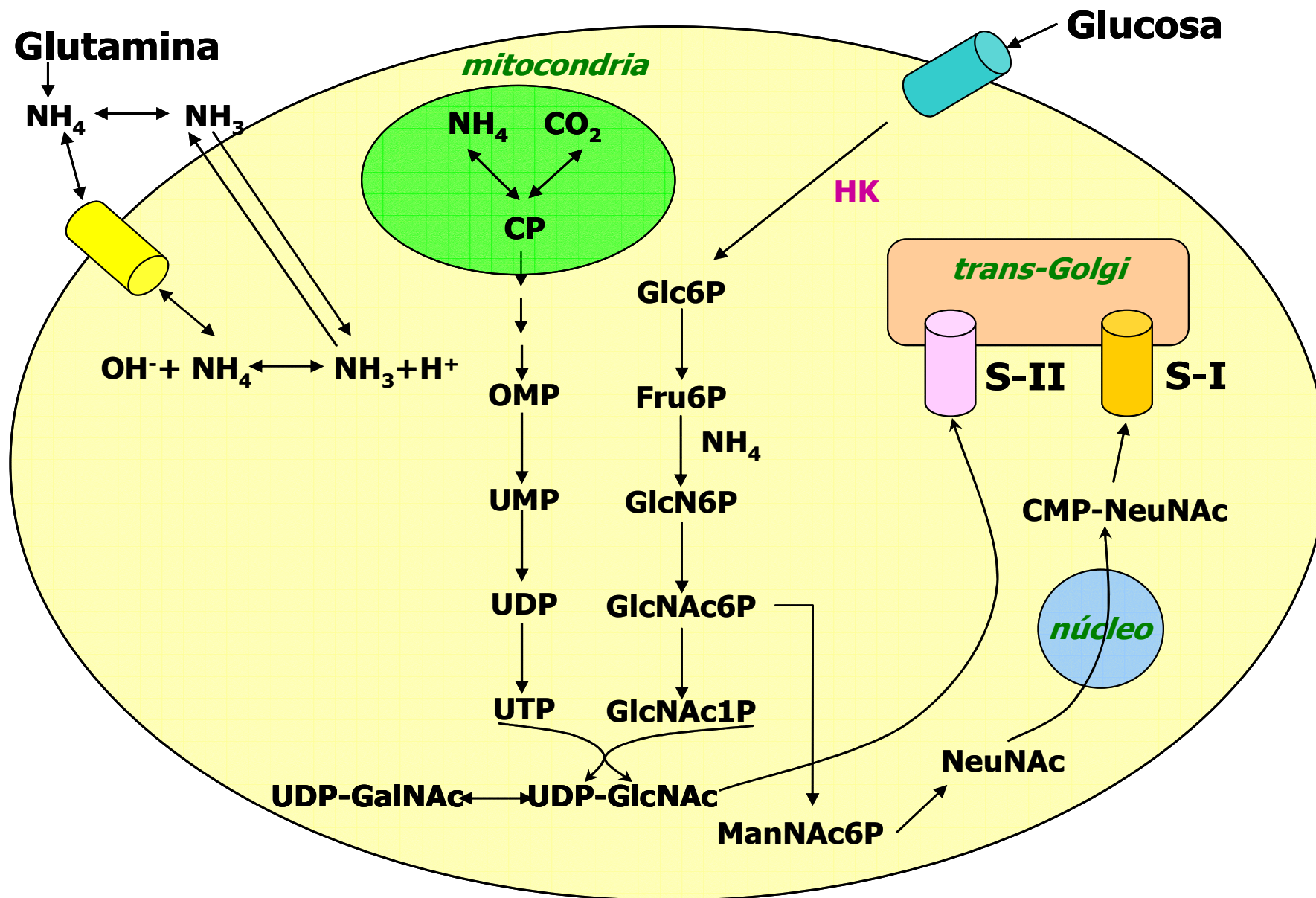


Fig. 23: Esquema de la vía de síntesis de UTP, UDP-GNAc y CMP-NeuNAc en las células de mamífero cultivadas *in vitro*.

de UDP-GNAc. Los resultados de estos autores, sin embargo, no coinciden con la disminución en la sialidación de los N-glicanos reportada por Pels Rijcken y col. (1995), al adicionar glucosamina al cultivo de hepatocitos de rata. Los experimentos de Grammatikos y col. (1998) indican que la adición de glucosamina causa solamente un aumento en la antenaridad de los carbohidratos *N-linked*, mientras que el amonio reduce además el grado de sialidación de los mismos, lo que indica que la disminución en la sialidación causada por la adición de amonio no sería consecuencia de un aporte insuficiente de CMP-NeuNAc para satisfacer el aumento en la demanda de ácido siálico terminal. Sus resultados apoyan lo propuesto por otros autores (Borys y col, 1993; Maiorella, 1992; Thorens y Vassalli, 1986), quienes afirman que la reducción del contenido de ácido siálico causada por el amonio se debería a una variación en el pH intracelular. De esta manera, el amonio influiría negativamente sobre la glicosilación a través de dos mecanismos independientes: el aumento en la síntesis de UDP-GNAc y la variación de la acidez en los distintos compartimientos intracelulares.

Sin embargo, al evaluar concentraciones sustancialmente más altas de ambos compuestos (20-40 mM NH₄Cl y >10 mM glucosamina), Yang y Butler (2000a; 2002) verificaron una disminución en las estructuras tetra-antenarias de la rhEPO producida en células CHO, paralelamente a un incremento en las estructuras bi- y tri-antenarias. Al comparar sus resultados con los publicados por Gawlitzek y col. (1998), estos autores atribuyen esta aparente contradicción del efecto del amonio sobre la antenaridad a la diferencia entre las líneas celulares empleadas y las proteínas producidas por ellas.

La forma acetilada de la glucosamina, la N-acetilglucosamina (GlcNAc), puede ser sintetizada *de novo* a partir de la glucosa (Fig. 23) o producida a través de vías de salvataje. La adición de GlcNAc al cultivo de fibroblastos murinos incrementa los niveles de UDP-GlcNAc en forma análoga a la glucosamina (Boehmelt y col., 2000), y permite restaurar la síntesis de los carbohidratos en las glicoproteínas a niveles normales en una línea mutante derivada de las células 3T3 Balb/c, entre otros efectos beneficiosos (Pouysségur y col., 1977). No se han encontrado hasta el momento trabajos determinando el efecto de la suplementación del medio de cultivo con GlcNAc sobre la antenaridad de las cadenas de carbohidratos asociadas a proteínas, aunque es razonable pensar que este aminoazúcar acetilado tendría una acción similar a la de la glucosamina, debido al punto de la vía metabólica de síntesis de UDP-GNAc al cual se incorpora.

La suplementación directa del medio de cultivo con ácido siálico o su forma activada CMP-NeuNAc no es una alternativa viable para lograr el incremento de la concentración intracelular de estas especies y favorecer así la sialidación de las

glicoproteínas, ya que ambas presentan una muy baja permeabilidad a la membrana celular (Gu y Wang, 1998). Como se ha mencionado, por otro lado, la N-acetilmanosamina es un precursor en la síntesis de ácido siálico en la mayoría, si no en todas, las células eucariotas (Ferwerda y col., 1983). A pesar de que la ManNAc se produce intracelularmente a partir de la 2-epimerización de N-acetilglucosamina y/o UDP-N-acetilglucosamina, la adición exógena de este aminoazúcar induce su incorporación bajo la forma de ácido siálico en animales, láminas de tejido vivo y células en cultivo, indicando que, a diferencia del NeuNAc y CMP-NeuNAc, la membrana celular es altamente permeable al ingreso de ManNAc a pH fisiológico (Ferwerda y col., 1983; Gu y Wang, 1998). La suplementación del medio de cultivo con ManNAc, por otro lado, induce una disminución del *pool* de UDP-GNAc, contrariamente a lo observado para la glucosamina (Baker y col., 2001).

El trabajo publicado por Gu y Wang (1998) mostró que adicionando 2 mM y 20 mM de ManNAc al cultivo en *batch* de células CHO productoras de IFN- γ , el porcentaje de ácido siálico de la molécula producida proveniente del aminoazúcar agregado correspondía a un 60% y 100%, respectivamente. No se verificó, por lo tanto, una discriminación entre el CMP-NeuNAc originado intracelularmente y el derivado a partir de la ManNAc adicionada, en los procesos de transporte y sialidación. La adición de 20 mM de este aminoazúcar, asimismo, indujo un incremento de aproximadamente 30 veces el contenido intracelular de CMP-NeuNAc, fenómeno reportado también por otros autores – si bien en menor medida – para células CHO (Baker y col., 2001), para células COS-7 (Angata y col., 1999) y para células NS0 (Baker y col., 2001). Esto indica que la síntesis del CMP-NeuNAc a partir de ManNAc exógena no está regulada por su producto, lo que sí ocurre a nivel de las epimerasas que catalizan la conversión de UDP-GlcNAc y GlcNAc en ManNAc. Se concluye también a partir de estos resultados que la síntesis de CMP-NeuNAc tampoco depende de la disponibilidad de las enzimas involucradas en ella.

Gu y Wang (1998) observaron también una disminución en la proporción de estructuras biantenarias sialidadas en forma incompleta (26% en el caso de la suplementación con de 2 mM ManNAc y 20% en el caso de 20 mM). Sin embargo, estos autores verificaron que el agregado de una baja (0,2 mM) o una muy alta (40 mM) concentración de ManNAc, no provocó mejoras en la sialidación de los N-glicanos. A pesar de estos resultados, el efecto beneficioso de la adición de ManNAc fue limitado, proponiendo los autores dos posibles explicaciones a este hecho: en primer lugar, una saturación del transporte de CMP-NeuNAc hacia el *trans*-Golgi o, más probablemente, una limitación estérica para la accesibilidad al sitio de sialidación de la molécula. De acuerdo con lo reportado por Baker y col. (2001), la sialidación de la proteína TMP-1 producida tanto en células CHO como en células NS0 tampoco se vio significativamente mejorada por la

adición de 20 mM de ManNAc, aunque la relación entre el ácido N-glicolilneuramínico (un antígeno oncofetal potencialmente inmunogénico, sintetizado por las líneas celulares de origen murino) y el ácido N-acetilneuramínico se vio significativamente mejorada, pasando de 1:1 a 1:2.

En resumen, los conceptos más destacados de lo expuesto hasta aquí son los siguientes:

- El incremento del *pool* de UDP-GNAc (debido a la adición de glucosamina y/o GlcNAc, por ejemplo) provoca un aumento en la antenaridad, así como también en el grado de incorporación de N-acetilhexosaminas a las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas celulares, ya sean éstas asociadas o de secreción.
- Los efectos negativos sobre la sialidación debido a altas concentraciones intracelulares de los azúcar-nucleótidos no son concluyentes (Grammatikos y col., 1998; Pels Rijcken y col., 1995).
- La suplementación con otro aminoazúcar, ManNAc, induce un aumento en el contenido intracelular de CMP-NeuNAc, precursor del ácido siálico que se encuentra en la posición terminal de las cadenas de oligosacáridos en las glicoproteínas, así como una mejora global de la sialidación y/o composición de esas cadenas.

Resulta así razonable proponer el estudio del efecto conjunto de la GlcNAc y la ManNAc sobre el perfil de glicosilación de la rhEPO producida por el clon B1A2, con la expectativa de obtener un incremento en la antenaridad de la molécula, y un mayor contenido de N-acetilhexosaminas y de ácido siálico, factores que aumentan significativamente la actividad biológica específica de esta proteína (Yang y Butler, 2000c; Koll y col., 2000).

5.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se llevaron a cabo experimentos en los cuales se adicionó al medio SMIF 6 cantidades variables de GlcNAc y ManNAc, para analizar su influencia sobre el perfil de glicosilación de la molécula de rhEPO producida por el clon B1A2.

Como parte de una serie de experiencias destinadas a evaluar el efecto del amonio producido extracelularmente a partir de la glutamina sobre el crecimiento y productividad

celulares, así como sobre el perfil de isoformas de rhEPO producidas durante el cultivo, se estudió también la cinética de descomposición de este aminoácido en condiciones de temperatura y pH variables.

A raíz de los resultados obtenidos, se realizaron nuevos cultivos a los cuales se adicionaron concentraciones variables de NH_4Cl , con el fin de estudiar el potencial efecto del anión sobre el clon B1A2, cuando aquél se encuentra presente en el medio de cultivo al momento de uso.

Finalmente se analizó el efecto de la adición de concentraciones crecientes de NaCl al medio SMIF 6 con el fin de establecer la sensibilidad del clon B1A2 frente a variaciones en la osmolalidad del medio de cultivo que podrían resultar del uso de aditivos empleados en la mejora del proceso, y así establecer si los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se debían a un efecto específico del componente agregado, o a un efecto combinado entre esto y el aumento de osmolalidad resultante de la adición de dicho componente.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Efecto de la adición de GlcNac al medio de cultivo

Antes de iniciar las experiencias planificadas se analizó el incremento de osmolalidad del medio de cultivo debido al agregado del aminoazúcar, y la posible formación de amonio a partir de esta molécula, debido a que podrían convertirse en factores influyentes sobre las respuestas evaluadas.

Para ello, se agregó un volumen de 2 ml por pozo a una placa de 12 pozos con los siguientes medios (7 pozos por cada medio de cultivo analizado):

- 0 mM GlcNAc (control)
- 0,2 mM GlcNAc
- 2 mM GlcNAc
- 20 mM GlcNAc
- 50 mM GlcNAc
- 100 mM GlcNAc

La placa fue incubada durante 7 días en estufa gaseada, y diariamente se tomó el medio de cultivo de un pozo correspondiente a cada condición estudiada, determinándose la

concentración de amonio. Las curvas obtenidas se presentan en la Fig. 24.

Se midió además la osmolalidad de las muestras correspondientes a $t=0$ (por duplicado), para establecer cómo ésta variaba en función de la concentración de GlcNAc. Los resultados de estas mediciones fueron ajustados mediante una regresión lineal, generándose la recta que se observa en la Fig. 25.

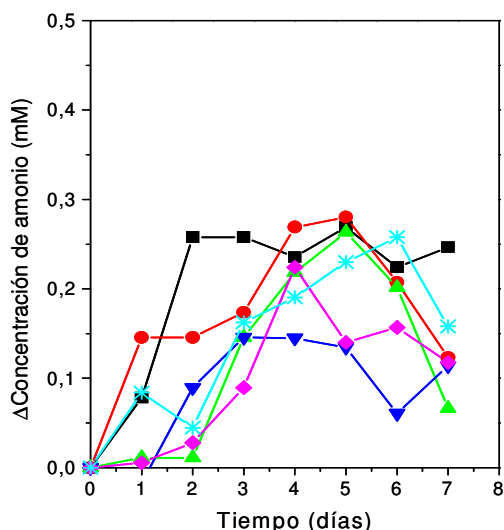


Fig. 24: Evolución de la concentración de amonio en el medio de cultivo SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de GlcNAc e incubado a 37°C y 5% CO₂: (■) control, (●) 0,2mM (▲) 2mM, (▼) 20mM, (◆) 50mM, (✱) 100mM.

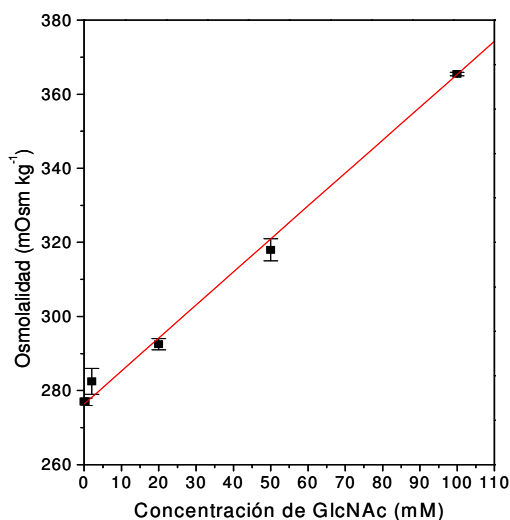


Fig. 25: Determinación de la osmolalidad del medio de cultivo SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de GlcNAc ($\bar{X} \pm SEM$).

Se verificó que la concentración de amonio varió en forma relativamente similar en todos los casos, alcanzándose valores iguales o inferiores a los obtenidos en el control sin adición de GlcNAc.

En cambio el agregado de este aminoazúcar al medio de cultivo provoca los incrementos esperados en la osmolalidad (aproximadamente 0 ; 2 y 20 mOsm kg⁻¹, para las concentraciones de 0,2 , 2 y 20 mM GlcNAc, respectivamente).

5.4.2. Estudio del efecto de la adición de GlcNAc sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2

Las experiencias descritas a continuación contemplaron el estudio de un factor – la

GlcNAc – en diferentes niveles. En ellas se analizaron cuatro medios de cultivo, obtenidos al adicionar diferentes concentraciones de GlcNAc al medio SMIF 6. Los niveles evaluados de este aminoazúcar fueron:

- 0 mM GlcNAc (cultivo control)
- 0,2 mM GlcNAc
- 2 mM GlcNAc
- 20 mM GlcNAc

Se determinó la concentración de células viables de una suspensión del clon B1A2 en fase exponencial de crecimiento en medio SMIF 6, y se calculó el volumen necesario para obtener una masa de 10^6 células viables. Se tomaron cuatro alícuotas con este volumen, las cuales fueron centrifugadas 8 min a 200 *g*, resuspendiendo los *pellets* en 50 ml de cada uno de los medios de cultivo indicados (0; 0,2; 2 y 20 mM GlcNAc). Las suspensiones fueron homogeneizadas mediante agitación (50 rpm) durante una hora, a 37°C y 5% CO₂. Se tomó luego una muestra de 1,5 ml de cada cultivo, con el fin de determinar la concentración de células viables, para después centrifugar estas muestras durante 2 min a 600 *g*. El sobrenadante libre de células se conservó a -20°C para la posterior determinación de metabolitos. Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Fig. 26, en tanto los datos de velocidades específicas de consumo/producción de metabolitos están resumidos en la Tabla XXX.

Tabla XXX: Parámetros metabólicos específicos para los cultivos en suspensión del clon B1A2 en medio SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de GlcNAc.

Glc NAc mM	μ (h ⁻¹)	q_{glc} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{lac} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{am} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{gln} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{glu} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{rhEPO} (% 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)
0	0,0118±0,001 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> <0,0001	228±20 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,001	445±53 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,014	82±8, <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,010	72±2 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,001	19±2 <i>R</i> =0,98 <i>P</i> =0,017	0,821±0,082 <i>R</i> =0,98 <i>P</i> =0,0002
0,2	0,014±0,001 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,0003	232±26 <i>R</i> =0,98 <i>P</i> =0,003	448±64 <i>R</i> =0,98 <i>P</i> 0,020	71±24 <i>R</i> =0,90 <i>P</i> =0,098	67±7 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,011	15±3 <i>R</i> =0,98 <i>P</i> =0,028	0,835±0,072 <i>R</i> =0,98 <i>P</i> <0,0001
2	0,015±0,003 <i>R</i> =0,94 <i>P</i> =0,006	293±13 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,0002	492±34 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,005	85±12 <i>R</i> =0,97 <i>P</i> =0,005	62±6 <i>R</i> =0,98 <i>P</i> =002	13±1 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,0009	0,761±0,038 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> <0,0001
20	0,008±0,001 <i>R</i> =0,95 <i>P</i> =0,0003	210±13 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> <0,0001	383±39 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,002	92±13 <i>R</i> =0,96 <i>P</i> =0,002	61±3 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> =0,0003	14±1 <i>R</i> =0,98 <i>P</i> =0,0004	1,126±0,046 <i>R</i> =0,99 <i>P</i> <0,0001

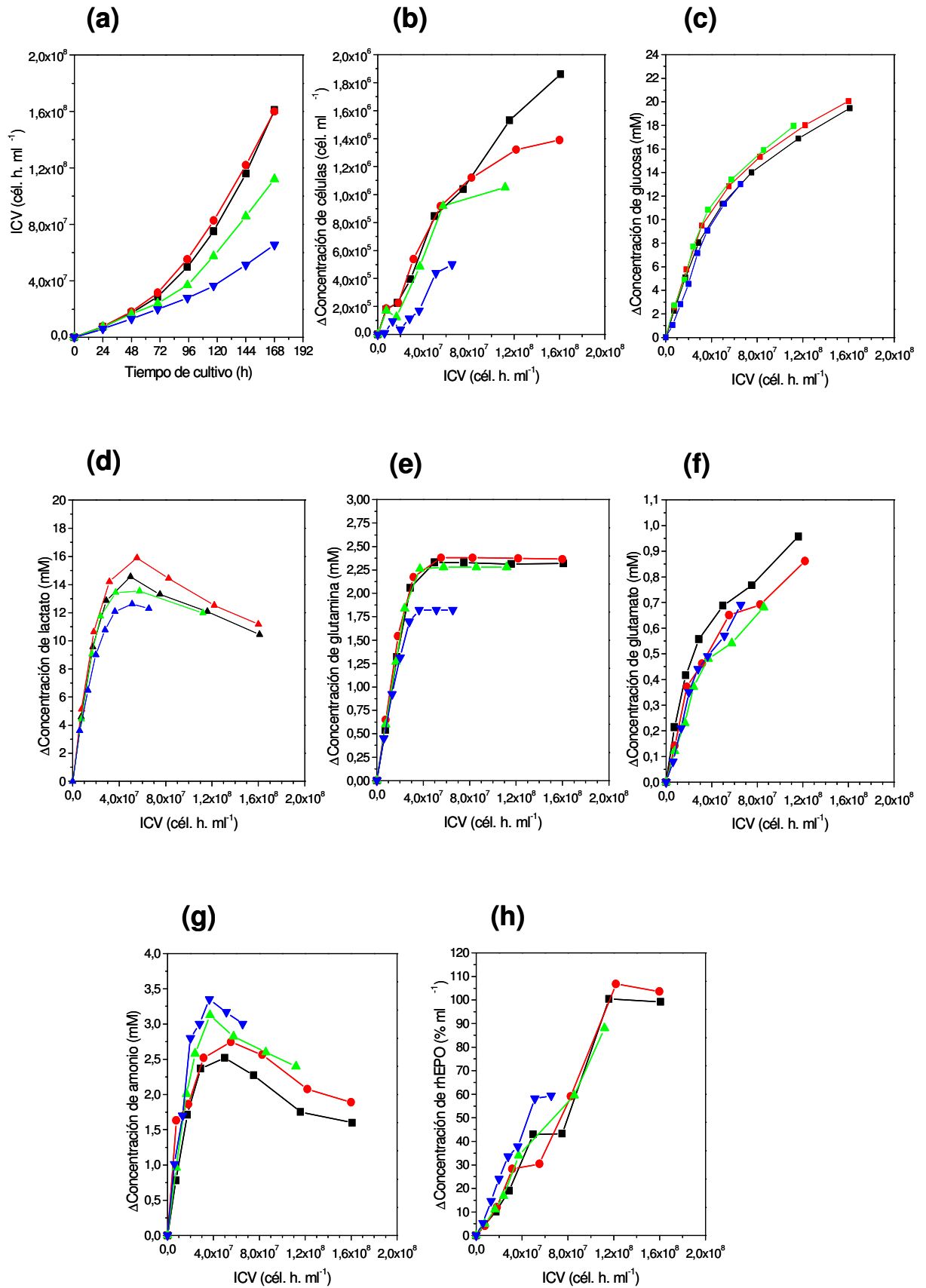


Fig. 26: Curvas de (a) ICV, (b) células, (c) glucosa, (d) lactato, (e) glutamina, (f) glutamato, (g) amonio y (h) rhEPO para los cultivos en suspensión del clon B1A2 en medio SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de GlcNAc: (■) control, (●) 0,2 mM, (▲) 2 mM, (▼) 20 mM.

Se observa en los gráficos de la Fig. 26 que el agregado del aminoazúcar provocó variación entre las concentraciones celulares máximas alcanzadas, aunque la velocidad específica de crecimiento durante las primeras 96 h fue similar para el cultivo control y los cultivos con 0,2 mM y 2 mM GlcNAc. Para estos tres casos no se verificó una limitación cinética y sí estequiométrica causada por la adición del aminoazúcar. Esta variación en las curvas de crecimiento no es consecuencia de una reducción en el transporte de la glucosa - como fuera observado por Yang y Butler (2002) al adicionar 10 mM de glucosamina al medio – ya que se verificaron perfiles de consumo de este nutriente casi idénticos comparados con el cultivo control. La hipótesis más probable sería la de una mayor acumulación intracelular de amonio (corroborada por la mayor excreción de este ion) en los cultivos con mayor contenido de GlcNAc. Se observó además una relación inversa entre el contenido de GlcNAc del medio y el tiempo de cultivo durante el que se mantuvo constante el valor máximo de la velocidad específica de crecimiento. En el cultivo con 20 mM GlcNAc, por otro lado, se verificó una fuerte inhibición del crecimiento, también en términos de μ .

En cuanto al consumo de glucosa y producción de lactato, el comportamiento de los cultivos con GlcNAc fue análogo al cultivo control, acumulándose levemente más lactato en el cultivo con 0,2 mM. La velocidad de consumo de la glucosa fue reduciéndose a partir de las 72 h, hasta ser finalmente agotada. En cuanto se verificaba esta disminución de la q_{glc} , la q_{lac} se mantenía constante por otras 24 h, para hacerse negativa luego de alcanzar la concentración máxima de este catabolito en el sobrenadante. El valor negativo de q_{lac} indicó la probable re-metabolización del lactato por parte de las células, lo que dio origen a la disminución de su concentración observada hasta el final de los cultivos.

Por otra parte, las cuatro suspensiones celulares analizadas mostraron cinéticas de consumo de glutamina así como de producción de glutamato muy similares. La glutamina fue completamente consumida en los cultivos control y adicionados con 0,2 mM y 2 mM GlcNAc a las 96 h, momento en el cual se observó el inicio del consumo del lactato, como una fuente de carbono y energía alternativa. Cuando la concentración de glutamina del medio de cultivo alcanzó niveles muy bajos ($\text{ICV} \approx 3 \times 10^7 \text{ cél. h ml}^{-1}$, aproximadamente) se verificó una disminución en la velocidad de producción del glutamato, aunque su producción continuó hasta el final de la experiencia. Una vez que se hubo consumido completamente la glutamina, la concentración de glutamato también se mantuvo constante, indicando que la síntesis de glutamina a partir de aquél no es una de las vías metabólicas de preferencia del clon B1A2, al menos cuando es cultivado en el medio MCE con 0,2% (V/V) SFB. Los valores de q_{glu} obtenidos confirman esta observación, ya que son sustancialmente más altos que los reportados por Yoon y col. (2005) para otra línea de células CHO productora de rhEPO ($5,33 \text{ nmol } 10^{-6} \text{ cél}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $\text{pH}=7,20$).

En todos los casos, el cultivo con mayor contenido de GlcNAc mostró siempre valores finales de consumo/producción acumulados inferiores a la de las otras suspensiones celulares, hecho que se debería a la menor cantidad de células presentes en este cultivo (como se desprende de la curva de consumo de glucosa) o a un período de tiempo de cultivo menor durante el que se mantiene constante el valor de velocidad específica (por ejemplo, en el gráfico de consumo de glutamina).

Sin embargo, en lo que respecta a la acumulación de amonio en sobrenadante, el valor de q_{am} se mantuvo constante por más tiempo en los cultivos con GlcNAc (72 h para el cultivo con 0,2 mM, 96 h para el cultivo con 2 mM y 120 h para el cultivo con 20 mM), lo que resultó en una mayor acumulación de amonio en el sobrenadante de cultivo con respecto a la suspensión control (25% más en el cultivo con 20 mM con respecto al cultivo sin GlcNAc). Esta mayor acumulación de amonio derivada del metabolismo de la GlcNAc podría ser la causa de la inhibición en el crecimiento celular. La acumulación máxima de amonio fue alcanzada rápidamente, entre las 48 y las 72 h, en tanto la inhibición del crecimiento en los cultivos con 0,2 mM y 2 mM se verificó a partir de las 96 h, confirmando que el efecto del amonio sobre la proliferación no es inmediato y se relaciona con la alteración de procesos enzimáticos y/o de utilización de la energía intracelular. Las diferencias en la concentración máxima de amonio alcanzada en los cultivos con 0,2 mM y 2 mM GlcNAc con respecto al cultivo control fueron de aproximadamente 10% y 23%, respectivamente, mientras que la reducción en la densidad celular observada fue superior al 25% para el cultivo con 0,2 mM y al 43% para el cultivo con 2 mM de GlcNAc. Estos resultados indican que al acumularse amonio en concentraciones críticas para la tolerancia del clon, un aumento leve en la concentración induce severas restricciones al crecimiento. Luego de alcanzar el máximo de concentración, se observó una progresiva reducción del contenido de amonio, inclusive en el cultivo control, probablemente debido al secuestro de este ion por α -cetoácidos provenientes del catabolismo de la glucosa y la glutamina para incorporarlo en otras moléculas excretadas, como por ejemplo alanina, glutamato y glicina como mecanismos orientados a disminuir los niveles de amonio en el medio extracelular (Yang y Butler, 2000a).

Las muestras de los sobrenadantes de cultivo se concentraron y purificaron, para luego ser analizadas por IEF seguido de *Western blot* y densitometría de las bandas, sembrándose una masa de 0,35 μ g de rhEPO por carril. La proporción relativa porcentual de cada isoforma presente en las muestras estudiadas se resume en la Tabla XXXI.

Tabla XXXI: Proporción relativa de las isoformas de la molécula de rhEPO producida por el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de GlcNAc.

Isoforma	Control	0,2 mM	2 mM	20 mM
-3	12,5	13,3	15,0	16,9
-2	11,1	9,4	14,7	17,3
-1	10,8	12,2	12,7	15,4
0	12,4	12,7	11,2	10,9
1	12,3	10,0	9,6	10,2
2	9,3	9,5	9,1	9,1
3	8,9	9,3	8,7	7,9
4	8,4	8,9	7,8	6,5
5	7,2	8,0	6,9	4,6
6	5,3	5,2	4,4	1,3
7	1,9	1,7	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND

La Tabla XXXI muestra que en la medida en que se incrementa la concentración de GlcNAc en el medio de cultivo, disminuye la proporción de isoformas ácidas a la vez que aumenta la de la porción menos ácida, verificándose inclusive la desaparición de la isoforma de mayor contenido de ácido siálico en los cultivos con 2 y 20 mM.

Este efecto podría deberse a una acción específica de la GlcNAc o a los altos niveles de amonio generados en los cultivos conteniendo esta molécula. No debe dejar de considerarse la posibilidad de que el incremento en la osmolalidad del medio de cultivo debido a la adición de 20 mM de GlcNAc afectara el perfil obtenido. En efecto, en base a resultados que se presentan más adelante en este trabajo, es posible concluir que las alteraciones sobre el crecimiento y la glicosilación de la rhEPO observados en estas condiciones (20 mM GlcNAc) se deben a un efecto conjunto de ambos factores (el aminoazúcar y la osmolalidad), y no solamente al incremento de la concentración de esta última.

5.4.3. Estudio del efecto de la adición de GlcNAc y ManNAc sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2

En forma simultánea con las experiencias descritas anteriormente, se llevó a cabo el estudio del efecto de la adición individual o combinada de la GlcNAc y la ManNAc.

Para ello se empleó un diseño experimental factorial de tipo 2^k , $k=2$, el cual permite evaluar el efecto individual de dos factores, en este caso los aminoazúcares, en k niveles

cada uno. El diseño fue aumentado con el punto central correspondiente a la concentración media de los aminoazúcares.

Los niveles evaluados de cada factor pueden escribirse en forma codificada, indicando como -1 el nivel más bajo de cada factor, y como +1 el nivel más alto. El valor 0 asignado a cada factor corresponde a la concentración promedio entre los niveles -1 y +1.

En base a la bibliografía (Baker y col., 2001; Gu y Wang, 1998; Boehmelt y col., 2000; Pouysségur y col., 1977), se eligieron los siguientes niveles para cada uno de los factores en estudio:

Tabla XXXII: Concentraciones de GlcNAc y ManNAc utilizadas, y su forma codificada.

Factor	Nivel	
	-1	+1
GlcNAc	0,0 mM	6,0 mM
ManNAc	0,0 mM	14,0 mM

El valor 0 asignado para la GlcNAc fue, consecuentemente, 3 mM, en tanto que el valor 0 correspondiente a la ManNAc fue igual a 7 mM.

En la Fig. 27 se muestra la representación de los puntos experimentales evaluados. El punto de coordenadas (-1 ; -1) correspondió al cultivo control, sin la adición de ninguno de estos aminoazúcares.

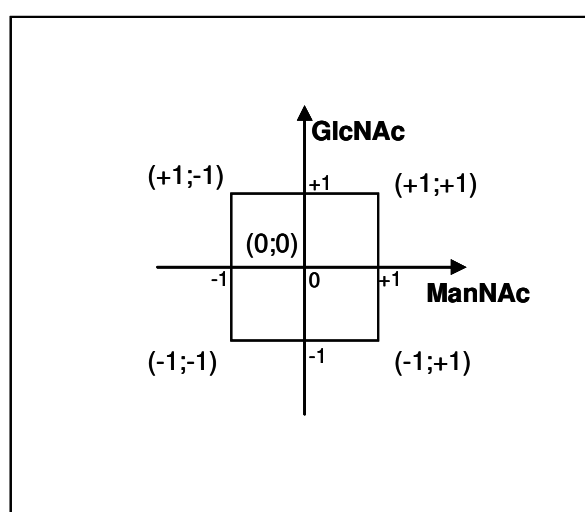


Fig. 27: Representación del diseño experimental 2^2 utilizado.

De esta forma se evaluaron cinco medios de cultivo diferentes, cuya composición puede ser escrita en forma codificada como:

- (-1 ; -1) = [0,0 mM GlcNAc; 0,0 mM ManNAc]
- (-1 ; +1) = [0,0 mM GlcNAc; 14,0 mM ManNAc]
- (0 ; 0) = [3,0 mM GlcNAc; 7,0 mM ManNAc]
- (+1 ; -1) = [6,0 mM GlcNAc; 0,0 mM ManNAc]
- (+1 ; +1) = [6,0 mM GlcNAc; 14,0 mM ManNAc]

Para realizar estas experiencias se partió de un cultivo del clon B1A2 en suspensión en medio SMIF 6 en fase de crecimiento exponencial: seis alícuotas de la suspensión fueron centrifugadas 8 min a 200 *g*, y el *pellet* celular fue resuspendido en 60 ml de los diferentes medios de cultivo estudiados, realizándose por duplicado el cultivo en el medio (0 ; 0) (indicados como **a** y **b**, respectivamente). La concentración celular inicial fue aproximadamente $2,5 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1} .

Se obtuvo una muestra diaria de cada uno de los cultivos, de un volumen entre 1,2 y 1,5 ml, utilizada para determinar la concentración de células viables y la viabilidad del cultivo, y la concentración de glucosa, lactato, amonio y rhEPO. Parte del sobrenadante fue purificado y concentrado por ultrafiltración, evaluándose el patrón de glicofomas de la proteína recombinante obtenido en cada uno de los cultivos, mediante IEF y posterior densitometría de las bandas reveladas por *Western blot*.

Las curvas metabólicas construidas a partir de estos datos experimentales se muestran en la Fig. 28. Los valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{am} y q_{rhEPO} obtenidos a partir de las curvas se presentan en la Tabla XXXIII.

De la observación de las curvas se desprende que todos aquellos cultivos conteniendo GlcNAc, aún en baja concentración, tuvieron un desarrollo menor (en términos de μ y concentración celular máxima alcanzada) que el cultivo control. Se destaca la similitud de los perfiles metabólicos en el cultivo realizado por duplicado (con 3 mM GlcNAc y 7 mM ManNAc). Solamente la suspensión cultivada en presencia de 14 mM ManNAc mostró un perfil de crecimiento similar al cultivo control, indicando que este aminoazúcar no afecta negativamente el crecimiento celular en las condiciones ensayadas, lo que concuerda con observaciones anteriormente publicadas (Gu y Wang, 1998; Baker y col., 2001).

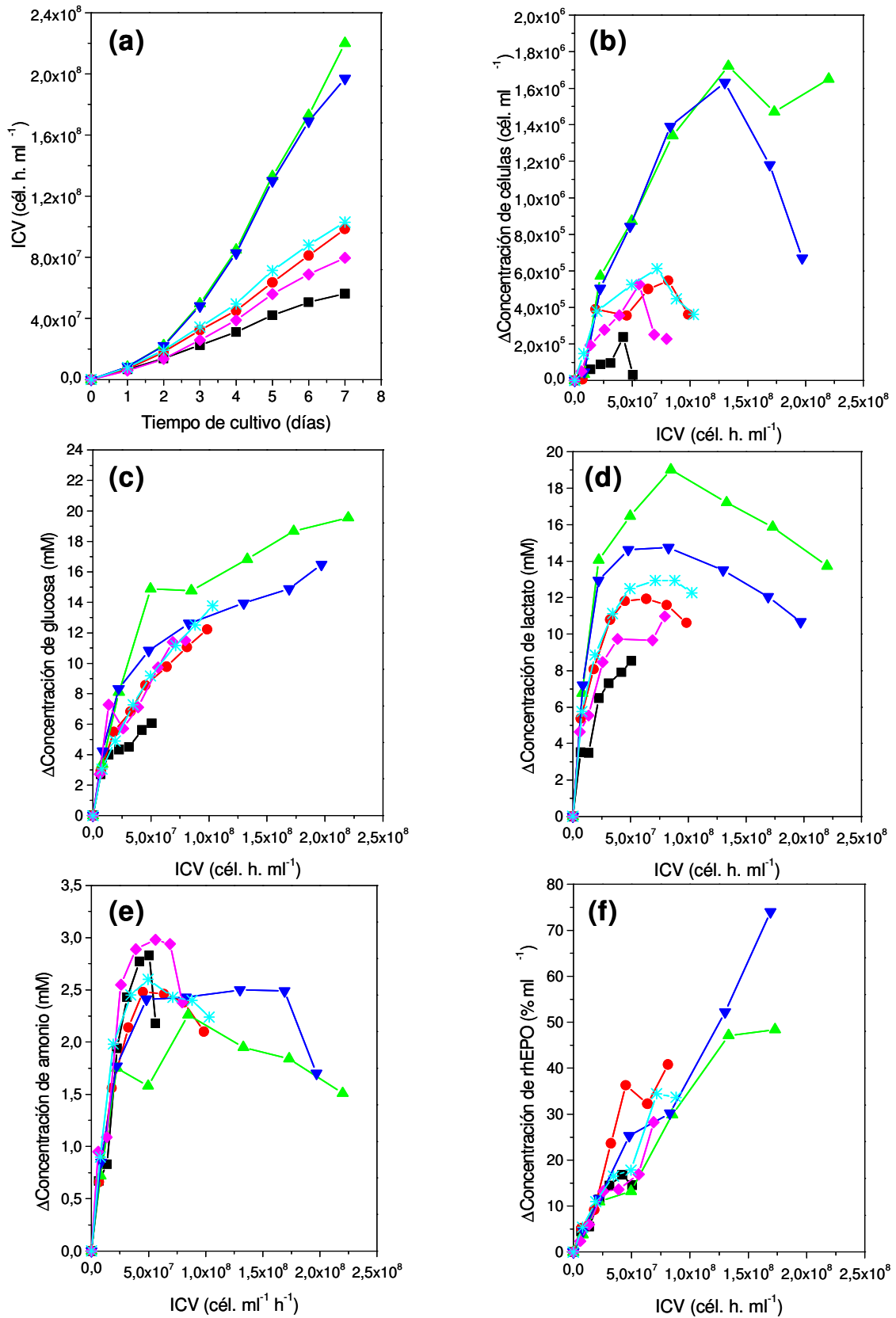


Fig. 28: Curvas de (a) ICV, (b) células, (c) glucosa, (d) lactato, (e) amonio y (f) rhEPO para el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio SMIF 6 adicionado con (GlcNAc;ManNAc): (■) (6 mM; 14 mM), (●) (3 mM; 7 mM), (▲) (0 mM; 0 mM), (▼) (0 mM; 14 mM), (◆) (6 mM; 0 mM), (✕) (3 mM; 7 mM).

Tabla XXXIII: Parámetros metabólicos específicos para los cultivos en suspensión del clon B1A2 en medio SMIF 6 adicionado con GlcNAc y/o ManNAc.

Medio	μ (h ⁻¹)	q_{glc} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{lac} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{am} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{rhEPO} (% 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)
(-1;-1)	0,013±0,002	294±23	618±83	78±4	0,344±0,023
	<i>R=0,98</i> <i>P=0,001</i>	<i>R=0,99</i> <i>P=0,006</i>	<i>R=0,99</i> <i>P=0,085</i>	<i>R=0,99</i> <i>P=0,034</i>	<i>R=0,99</i> <i>P=0,0001</i>
(-1;+1)	0,013±0,002	212±56	570±115	48±11	0,413±0,023
	<i>R=0,97</i> <i>P=0,001</i>	<i>R=0,94</i> <i>P=0,63</i>	<i>R=0,98</i> <i>P=0,126</i>	<i>R=0,95</i> <i>P=0,049</i>	<i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>
(0;0)a	0,007±0,002	176±29	308±75	54±8	0,516±0,079
	<i>R=0,91</i> <i>P=0,011</i>	<i>R=0,96</i> <i>P=0,009</i>	<i>R=0,95</i> <i>P=0,55</i>	<i>R=0,97</i> <i>P=0,006</i>	<i>R=0,95</i> <i>P=0,001</i>
(0,0)b	0,008±0,002	175±21	301±80	71±14	0,435±0,048
	<i>R=0,94</i> <i>P=0,017</i>	<i>R=0,98</i> <i>P=0,003</i>	<i>R=0,94</i> <i>P=0,063</i>	<i>R=0,96</i> <i>P=0,038</i>	<i>R=0,98</i> <i>P=0,001</i>
(+1;-1)	0,0091±0,0007	156±18	227±50	74±11	0,362±0,042
	<i>R=0,99</i> <i>P=0,001</i>	<i>R=0,98</i> <i>P=0,001</i>	<i>R=0,93</i> <i>P=0,020</i>	<i>R=0,97</i> <i>P=0,007</i>	<i>R=0,97</i> <i>P=0,0004</i>
(+1;+1)	0,0049±0,0009	179±50	223±40	69±7	0,458±0,041
	<i>R=0,93</i> <i>P=0,006</i>	<i>R=0,93</i> <i>P=0,70</i>	<i>R=0,96</i> <i>P=0,011</i>	<i>R=0,98</i> <i>P=0,001</i>	<i>R=0,99</i> <i>P=0,002</i>

La concentración máxima de células alcanzada en el cultivo control coincide aproximadamente con la observada en la experiencia de adición de GlcNAc (sección 5.4.2). Las otras curvas en este caso muestran un efecto inhibitorio asociado a la GlcNAc más marcado que en la experiencia anterior. El hecho de que el cultivo en presencia de los niveles máximos de ambos factores tuviera un desarrollo más lento y llegase a un valor de ICV menor que el cultivo con igual contenido de GlcNAc, pero sin ManNAc podría indicar un efecto negativo debido al incremento en la osmolalidad del medio de cultivo causado por la presencia de los dos aminoazúcares en alta concentración, al igual que fuera descrito anteriormente en la experiencia en la que se agregó 20 mM GlcNAc al cultivo (ver resultados posteriores).

La Fig. 28 muestra que tanto el consumo de glucosa como la producción de lactato a partir de ella se encuentran asociados a la producción de células en el cultivo, habiéndose consumido más glucosa (y producido más lactato, en consecuencia) en aquellos cultivos en los que se llegó a un valor más alto de ICV.

El efecto contrario se observa en la curva que muestra la producción de amonio: en la medida en que se incrementa el contenido de GlcNAc la acumulación del ion también lo hace, alcanzando niveles aproximadamente 25% superiores al control en los cultivos con 6 mM del aminoazúcar. Los cultivos con mayor concentración de GlcNAc (con y sin ManGlc) mostraron los niveles más altos de amonio, lo que no ocurrió cuando se suplementó el

cultivo exclusivamente con ManNAc, lo que indica que ambas especies se comportan en forma diferente desde el punto de vista de su capacidad amoniogénica. En todos los cultivos se observó, al igual que las experiencias descritas anteriormente, una reducción de la concentración de este ion en la fase final del cultivo, debido a su re-metabolización.

Los valores de velocidad específica de producción de la proteína recombinante obtenidos fueron similares para todos los cultivos, si bien debido a la menor concentración celular en los cultivos en presencia de GlcNAc la acumulación de la proteína en el sobrenadante de cultivo fue inferior. En el cultivo con el agregado de 14 mM ManNAc, la q_{rhEPO} se mantuvo constante por un mayor período de tiempo, lo que redundó en una mayor productividad volumétrica de rhEPO con respecto a la suspensión celular usada como control.

El patrón de glicosilación de la proteína secretada por el clon B1A2 en las condiciones de cultivo en estudio se determinó a partir de la concentración y purificación de la rhEPO presente en el sobrenadante por ultrafiltración, y el análisis de las bandas obtenidas al someter las muestras a IEF seguido de *Western blot*. La proporción de las isoformas en la mezcla producida se presenta en la Tabla XXXIV.

Tabla XXXIV: Proporción relativa de las isoformas de la molécula de rhEPO producida por el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio SMIF 6 adicionado con GlcNAc y/o ManNAc.

Isoforma	(+1;+1)	(0;0)	(-1;-1)	(-1;+1)	(+1;-1)	(0;0)
-3	17,3	19,7	14,9	13,3	17,2	19,0
-2	13,3	12,7	13,1	9,6	13,5	10,8
-1	15,2	12,7	13,1	11,8	14,4	12,9
0	13,6	12,9	12,9	13,0	15,3	11,3
1	11,2	11,5	12,4	11,8	12,4	9,3
2	9,9	10,2	10,8	11,4	10,2	9,7
3	7,9	9,4	9,9	10,7	8,3	10,0
4	6,8	7,8	8,0	10,1	6,5	10,3
5	3,4	4,8	5,1	6,0	2,9	5,6
6	1,3	2,4	3,2	3,1	1,3	2,3
7	ND	1,2	1,5	1,1	ND	1,0
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND

La presencia de GlcNAc en una concentración de 6 mM en el medio de cultivo (con o sin ManNAc) conllevó a la desaparición de la isoforma 7, y a una disminución en la proporción de la siguiente isoforma, si se la compara con el cultivo control (-1 ; -1).

Paralelamente, se vio incrementada la proporción de las isoformas menos acídicas en el conjunto total de éstas. Este hecho no se verificó en el cultivo sin GlcNAc y con 14 mM de ManNAc, por lo que puede considerarse un efecto específico de aquélla, a esta concentración.

En general, los medios de cultivo conteniendo ManNAc en distintas cantidades mostraron un perfil de glicosilación similar al cultivo control. La presencia de ManNAc en el cultivo con GlcNAc, por otra parte, no contribuyó a mejorar el patrón de glicosilación obtenido, con respecto al cultivo sin ManNAc e idéntica cantidad de GlcNAc. Estos resultados llevan a concluir que, si bien la adición de este aminoazúcar permite incrementar la productividad volumétrica de la rhEPO en un cultivo en modo *batch*, este efecto positivo no se extiende de forma sustancial a la calidad glicosídica de la proteína, lo que concuerda con las observaciones de otros autores (Baker y col., 2001). La sialidación incompleta verificada en presencia de ManNAc se debería entonces a una limitación en el transporte del CMP-NeuNAc hacia al *trans*-Golgi (a pesar de un probable aumento en la concentración intracelular de aquél) y no a un impedimento estérico, como fuera propuesto por Gu y Wang (1998).

Posteriormente a la realización de las experiencias descritas en este trabajo, fueron publicados los resultados de Park y col. (2004), quienes obtuvieron un 50% de aumento en la productividad de rhEPO hiperglicosilada en células CHO luego de la suplementación del medio de cultivo con ManNAc 20 mM y 0,5 mM de ácido 2-deoxi-2,3-dehidro-N-acetilneuramínico (un inhibidor de sialidasas). Lamentablemente, sólo se encuentra disponible en inglés un resumen de este artículo, publicado en su idioma original por la Sociedad Coreana de Microbiología y Biotecnología, por lo que no ha sido posible discutir sus resultados en el presente trabajo de tesis.

5.4.4. Estudio de la descomposición térmica de la glutamina presente en el medio de cultivo MCE al 0,2% (V/V) SFB

La detección de niveles inusualmente altos de amonio en las muestras de t=0 de algunos procesos de producción de rhEPO indujeron a estudiar las posibles causas de esta acumulación, y más adelante, su posible influencia sobre el crecimiento celular y el proceso de glicosilación de la rhEPO. Con este fin se analizó *a priori* un conjunto de condiciones de almacenamiento del medio de cultivo utilizado en el proceso, determinándose la variación en la concentración de glutamina, amonio y pH.

Se prepararon así seis litros de medio de cultivo MCE al 0,2% (V/V) SFB, cuyo pH se ajustó a 7,22 con HCl. El medio de cultivo preparado se separó en seis partes iguales,

cada una de las cuales fue colocada en un frasco de vidrio borosilicato (tipo SCHOTT) de capacidad 2.000 ml, con una salida a la cual se conectó un filtro de aire de 0,22 μm , a través de una manguera de silicona. Estos frascos fueron esterilizados previamente a su uso por 30 min a 121 °C. Una vez colocado el medio de cultivo en el frasco, a tres de ellos les fue inyectado CO_2 a través del filtro de aire, a una presión de 0,5 atm, estrangulando inmediatamente la manguera que une el frasco al filtro para mantener esta presión en el interior del recipiente. Las mangueras de los otros tres frascos fueron estranguladas inyectándoles únicamente aire, por lo que la cámara superior dentro del frasco sólo contenía aire estéril a 0,5 atm.

Posteriormente los frascos fueron separados en tres grupos, constituido cada uno por un frasco con CO_2 y otro con aire filtrado. Estos grupos fueron almacenados a tres temperaturas diferentes:

- 37 °C (en estufa)
- 4 °C a 8 °C (en cámara fría)
- 21 °C a 24 °C (temperatura ambiente controlada por el acondicionador de aire)

Dado que el medio de cultivo utilizado emplea el sistema $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ como tampón de pH, el mantener una presión de 0,5 atm de CO_2 desplazaría este equilibrio, impidiendo que el medio de cultivo se alcalinice por contacto con el aire. Aquellos frascos tratados con CO_2 se denominaron *medios de cultivo con pH controlado*, mientras que aquéllos sobre los que no se aplicó este gas se denominaron *medios de cultivo con pH no controlado*.

A tiempos preestablecidos se tomó una muestra de cada frasco, determinándose el pH en forma inmediata, con el fin de evitar variaciones provocadas por contacto con el aire. Luego de medir el pH, las muestras fueron congeladas a -20 °C para la posterior determinación de glutamina y amonio. Una vez tomada la muestra de los medios de cultivo se restauró la presión de CO_2 y de aire, respectivamente.

Esta experiencia se extendió por el período de un mes, tomándose muestras de los frascos en los siguientes tiempos: 0, 1, 2, 3, 6, 10, 15, 20, 25 y 32 días. En la Fig. 29 se muestra la evolución del pH así como de la concentración medida de glutamina y de amonio para cada una de las condiciones ensayadas.

En los gráficos se observa que aplicando una presión de 0,5 atm de CO_2 a las muestras, es posible mantener el pH en un rango de valores comprendido entre 6,5 y 7,0 en forma independiente de la temperatura a la que la muestra fue conservada.

Aquellas muestras a las que no se aplicó CO_2 mostraron un incremento del pH.

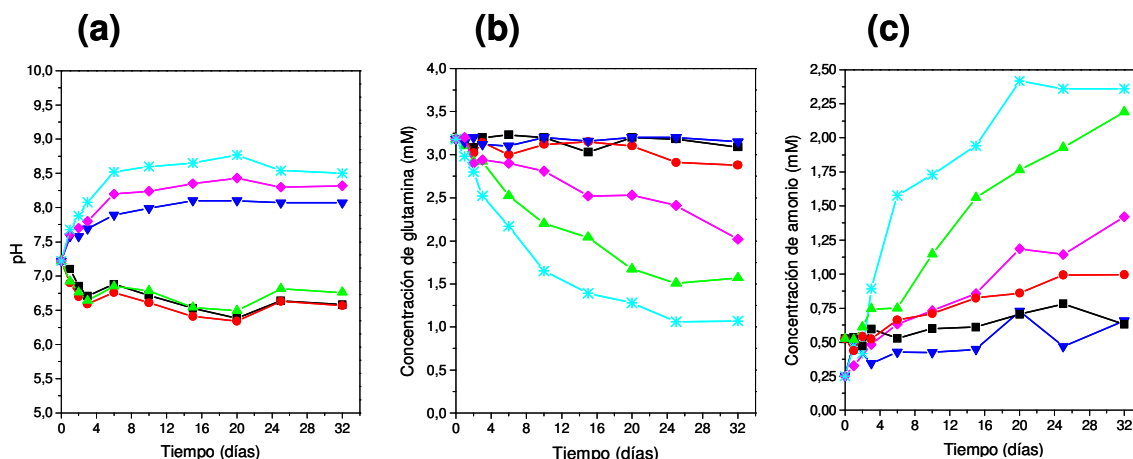


Fig. 29: Curvas de evolución de (a) pH, (b) concentración de glutamina y (c) concentración de amonio de las experiencias con medio de cultivo con pH controlado por presión de 0,5 atm de CO₂ y con medio de cultivo con pH no controlado. Muestras con pH controlado: (■) 4°C, (●) 25°C, (▲) 37°C; muestras con pH no controlado: (▼) 4°C, (◆) 25°C, (✕) 37°C.

directamente relacionado con la temperatura de almacenamiento, alcanzando un valor de 8,75 en el medio de cultivo conservado a 37°C. La variación de pH se produjo durante la primera semana de almacenamiento, manteniéndose relativamente constante a partir de ese momento. Las tasas de variación del pH en función de la temperatura de almacenamiento (calculadas a partir de las curvas de la Fig. 29) para las muestras sin control de pH se indican en la Tabla XXXV.

Tabla XXXV: Tasas de variación del pH en función de la temperatura de almacenamiento, calculadas para las muestras de medio de cultivo sin control de pH.

Muestras sin control de pH	Tasa de variación (unidades de pH/día)
4°C a 8°C	$0,10 \pm 0,02$ $R=0,91$ $P=0,031$
21°C a 24°C	$0,15 \pm 0,02$ $R=0,97$ $P=0,008$
37°C	$0,20 \pm 0,03$ $R=0,97$ $P=0,007$

Con respecto a la descomposición de glutamina y la consecuente formación de amonio a baja temperatura, pudo observarse que ambos son prácticamente independientes del pH del medio, ya que no se verificaron diferencias entre las muestras con aplicación de CO₂ y sin ella. En cambio, a temperatura ambiente, el pH afectó la cinética de descomposición del aminoácido: mientras en el medio sobre el que se aplicó CO₂ la

concentración de glutamina prácticamente no se vio alterada, en el medio sin CO₂ esta concentración cayó aproximadamente a dos tercios de su valor inicial, efecto que se vio intensificado cuando las muestras fueron almacenadas a 37°C. Evidentemente, la temperatura es el factor de mayor peso en la descomposición de la glutamina, aunque este proceso se ve potenciado cuando el pH se incrementa.

De esta forma, la temperatura favoreció el aumento del pH (probablemente debido a un conjunto de causas, entre las que se cuentan la liberación de CO₂ que se encontraba disuelto, el desplazamientos de equilibrios ácido-base débiles y/o la descomposición de otras moléculas termolábiles) y ambos factores, en diferente proporción, aumentaron la velocidad de descomposición de la glutamina. Esto se verificó más claramente en el caso de los medios de cultivo almacenados a una temperatura de 37°C, en donde ambos tipos de muestra (con y sin aplicación de CO₂) presentaron una caída en la concentración de esta molécula, aunque el mantenimiento de un entorno más ácido contrarrestó parcialmente este efecto, generándose menos amonio.

Las curvas de variación acumulada de glutamina y de amonio - calculadas de acuerdo con la Ec. (19) - en función del tiempo se ajustaron mediante una regresión lineal (datos no mostrados) con el fin de determinar la velocidad de descomposición y formación, respectivamente. Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla XXXVI.

Tabla XXXVI: Valores de velocidad de descomposición de glutamina y de formación de amonio calculadas para de las experiencias con medio de cultivo con pH controlado por presión de 0,5 atm de CO₂ y con medio de cultivo con pH no controlado.

Muestra	Velocidad de descomposición de glutamina (mM/día)		Velocidad de formación de amonio (mM/día)		Y _{am/gln}
4 °C a 8 °C (con CO ₂)	---	nd	---	0,009±0,001 R=0,93 P=0,0009	---
21 °C a 24 °C (con CO ₂)	R=0,83	0,007±0,002 P=0,051	R=0,99	0,018±0,001 P<0,0001	2,6±0,8
37 °C (con CO ₂)	R=0,98	0,066±0,005 P<0,0001	R=0,99	0,055±0,003 P<0,0001	0,83±0,07
4 °C a 8 °C (sin CO ₂)	---	nd	---	0,009±0,003 R=0,72 P=0,028	---
21 °C a 24 °C (sin CO ₂)	R=0,97	0,029±0,003 P<0,0001	R=0,98	0,035±0,003 P<0,0001	1,2±0,2
37 °C (sin CO ₂)	R=0,99	0,14±0,01 P=0,0009	R=0,97	0,23±0,03 P=0,005	1,6±0,2

En la tabla anterior no se incluyen los datos de velocidad de descomposición de la glutamina para los casos de conservación del medio a 4°C – 8°C, con y sin cámara de CO₂, debido a que no fue posible ajustar satisfactoriamente una recta de regresión sobre los mismos ($P > 0,5$ en ambos casos). El valor indicado para el caso del medio mantenido a 37°C sin cámara de CO₂ corresponde a la recta obtenida durante los primeros días de la experiencia (la de mayor pendiente).

Los valores más altos de glutamina perdida en el medio por descomposición térmica se obtuvieron, como era esperable, en los medios mantenidos a 37°C, ya sea con o sin control de pH por acción de CO₂. En todos los casos se verificó, sin embargo, un efecto beneficioso del control de pH para disminuir la formación de amonio.

En estos medios, así como en el medio mantenido a temperatura ambiente sin cámara de CO₂ se superó el valor de 1 mM NH₄⁺, lo cual, según se demostrará en experimentos posteriores, es suficiente para ejercer un efecto perjudicial sobre la calidad glicosídica de la molécula de rhEPO producida en estas condiciones, a pesar de que no se altera el resto de los parámetros metabólicos estudiados.

Desde un punto de vista del trabajo en escala de laboratorio, estos resultados alertan sobre la práctica de precalentar repetidas veces el medio de cultivo a ser utilizado en los cultivos, colocándolo en estufa a $T \geq 37^\circ\text{C}$ antes de utilizarlo. Para evitar esto, se recomienda almacenar el medio de cultivo en botellas de menor volumen, de manera de disminuir el número de veces de calentamiento y el mantenimiento de una gran cámara de aire por sobre el medio de cultivo hasta el consumo total del volumen del mismo, o tomar el volumen de medio que será usado, colocarlo en un recipiente estéril (el frasco de cultivo a ser usado, por ejemplo) y precalentar este último. Este tipo de cuidados contribuirá a disminuir la porción de glutamina que será descompuesta durante el almacenamiento, así como la acumulación de amonio en el medio de cultivo que podría en casos extremos afectar resultados experimentales. Considerando que durante las experiencias de cultivo de células, realizadas a 37°C, se favorecerá la generación espontánea de amonio – el cual aún en bajas concentraciones afecta el metabolismo celular, como se verá más adelante en este trabajo –, se hace evidente la necesidad de minimizar su acumulación en el medio de cultivo que será empleado en estos experimentos.

En el mismo sentido, los resultados obtenidos pueden aplicarse directamente a los procesos productivos, particularmente aquellos procesos continuos con perfusión de medio de cultivo, en los que es preciso mantener un recipiente desde el cual se alimenta al biorreactor, ya que generalmente éste se mantiene a temperatura ambiente, colocado físicamente al lado del fermentador. Cuando la velocidad de perfusión aún es baja, este

medio de cultivo puede permanecer el tiempo suficiente para que parte de la glutamina se descomponga, aumentando los niveles de amonio en el medio de cultivo que ingresa al fermentador. Si se considera que los niveles de amonio alcanzados durante el cultivo son críticos por su efecto sobre los procesos de glicosilación, como se verá más adelante a partir de los datos obtenidos, se desprende que refrigerar el recipiente con medio de cultivo fresco que se encuentra conectado al fermentador durante la perfusión puede resultar de gran utilidad para mejorar el proceso productivo. Manteniendo a baja temperatura el medio de cultivo de alimentación, no resultaría imprescindible mantener un control del pH del mismo mediante la aplicación de presión de CO₂.

El fenómeno observado puede extenderse a otros medios de cultivo, si bien la descomposición de la glutamina podría verse afectada en forma diferente, dependiendo de la composición de cada medio en particular. Aún así, las condiciones recomendadas de almacenamiento y manipulación en términos del control de T y pH se aplicarán a todos ellos.

5.4.5. Estudio del efecto del ion amonio presente en el entorno celular sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2

A raíz de la acumulación de amonio verificada en las experiencias anteriores, y que sería análoga a la manipulación inapropiada del medio de cultivo, se estudió el efecto que la presencia del ion amonio en el medio de cultivo a ser utilizado para el cultivo del clon B1A2 tendría sobre su productividad y metabolismo.

Para ello se prepararon cuatro medios de cultivo, a partir de medio SMIF 6 al cual se adicionaron las siguientes cantidades de NH₄Cl:

- 0 mM NH₄Cl (cultivo control)
- 1,5 mM NH₄Cl
- 2,5 mM NH₄Cl
- 4,0 mM NH₄Cl

Partiendo de un cultivo en fase exponencial de crecimiento del clon B1A2 en suspensión en medio SMIF 6, se cosecharon cuatro alícuotas, las cuales fueron centrifugadas 8 min a 200 *g*. Cada *pellet* fue resuspendido en 50 ml de uno de los medios indicados anteriormente, dejando el cultivo durante una hora en agitación de 50 rpm, a 37 °C y 5% CO₂. Una vez homogeneizado, se tomó una alícuota de 1,5 ml de cada cultivo sobre la cual se procedió a realizar el recuento de las células (muestra a tiempo=0). Luego las muestras fueron centrifugadas 2 min a 600 *g*, y el sobrenadante se conservó a -20 °C para la posterior determinación de nutrientes y catabolitos.

El procedimiento de toma de muestra se repitió cada 24 h durante todo el cultivo, obteniéndose los resultados que se encuentran graficados en la Fig. 30. La concentración de amonio medida a lo largo de la experiencia en función del tiempo de cultivo se presenta en la Fig. 31.

Los parámetros metabólicos específicos calculados a partir de estos resultados experimentales se resumen en la Tabla XXXVII.

Tabla XXXVII: Parámetros metabólicos específicos para los cultivos en suspensión del clon B1A2 en medio SMIF 6 adicionado con NH₄Cl.

NH ₄ Cl	μ (h ⁻¹)	q_{glc} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{lac} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{am} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{rhEPO} (% 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)
0 mM	0,018±0,002 <i>R=0,99</i> <i>P=0,0007</i>	161±25 <i>R=0,98</i> <i>P=0,024</i>	288±78 <i>R=0,97</i> <i>P=0,168</i>	39±12 <i>R=0,95</i> <i>P=0,193</i>	1,583±0,310 <i>R=0,98</i> <i>P=0,123</i>
1,5 mM	0,0229±0,0005 <i>R=0,99</i> <i>P=0,0005</i>	155±34 <i>R=0,95</i> <i>P=0,047</i>	320±65 <i>R=0,98</i> <i>P=0,127</i>	68±14 <i>R=0,98</i> <i>P=0,132</i>	1,636±0,310 <i>R=0,98</i> <i>P=0,119</i>
2,5 mM	0,017±0,003 <i>R=0,97</i> <i>P=0,033</i>	222±43 <i>R=0,97</i> <i>P=0,035</i>	438±85 <i>R=0,98</i> <i>P=0,122</i>	227 <i>R=1</i> <i>P<0,0001</i>	2,090±0,3,844 <i>R=0,98</i> <i>P=0,116</i>
4 mM	0,006±0,002 <i>R=0,96</i> <i>P=0,184</i>	178±14 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	238±24 <i>R=0,98</i> <i>P=0,0002</i>	65,6±0,6 <i>R=0,99</i> <i>P=0,006</i>	1,315±0,296 <i>R=0,95</i> <i>P=0,047</i>

Los cultivos adicionados con 1,5 y 2,5 mM NH₄Cl presentaron un desarrollo similar al cultivo control, en términos de μ , ICV y densidades celulares máximas alcanzadas. No ocurrió lo mismo con el cultivo al cual se agregó 4 mM NH₄Cl, el cual no consiguió desarrollarse en estas condiciones.

Considerando que en la Fig. 30 se representan los valores normalizados de concentración de amonio (es decir, la concentración actual menos la concentración a t=0), la acumulación del ion en el sobrenadante de cultivo se encuadró dentro de valores normales (1,5 mM – 2,5 mM), si bien se observó que la concentración máxima alcanzada estuvo correlacionada con la cantidad inicial de NH₄Cl adicionada al cultivo: para aquellos cultivos que mostraron crecimiento normal, a mayor concentración inicial de esta sal, mayor acumulación de amonio en el sobrenadante de cultivo. La presencia de amonio en el medio extracelular no inhibe la formación intracelular y liberación del mismo, siendo que, por el contrario, los niveles acumulados están en correlación directa con la concentración inicial del ion.

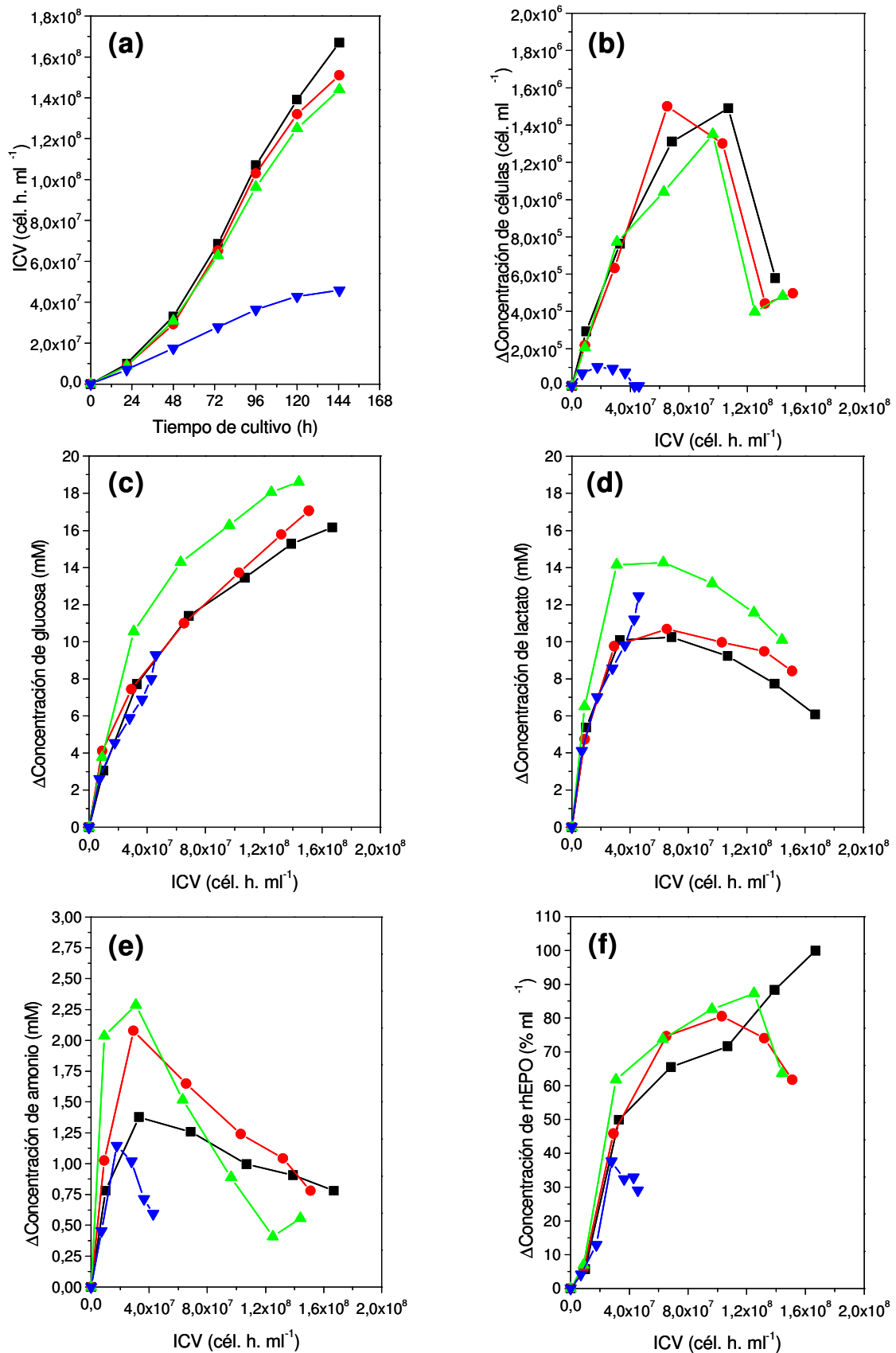


Fig. 30: Curvas de (a) ICV, (b) células, (c) glucosa, (d) lactato, (e) amonio y (f) rhEPO para el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio SMIF 6 adicionado con NH_4Cl : (■) control sin NH_4Cl , (●) 1,5 mM; (▲) 2,5 mM y (▼) 4 mM.