

Fig. 31: Curvas de evolución de la concentración de amonio en función del tiempo de cultivo para el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio SMIF 6 adicionado con NH₄Cl: (■) control sin NH₄Cl, (●) 1,5mM; (▲)2,5mM y (▼) 4mM.

A raíz de estos resultados se estableció que el umbral de tolerancia del clon B1A2 para este ion se encuentra alrededor de 4,5 mM (concentración alcanzada por la suma de la producción tanto intra como extracelular de amonio, Fig. 31). Asimismo se determinó que una concentración levemente superior (5 – 6 mM), resulta fuertemente inhibitoria del crecimiento de este clon. La concentración de amonio alcanzó el valor umbral a las 48 h de cultivo (suspensión cultivada en medio SMIF 6 al que se agregó 2,5 mM NH₄Cl), observándose inmediatamente después una reducción de la velocidad específica de crecimiento. Las células continuaron creciendo, sin embargo, hasta llegar a una densidad similar a la del cultivo control, lo que fue posible probablemente por la significativa reducción en la concentración de amonio en el sobrenadante que se verificó en forma simultánea. Este resultado permite inferir que los mecanismos empleados por el clon B1A2 para detoxificar el amonio mediante su re-metabolización son altamente efectivos (para niveles inferiores al valor umbral de 4,5 mM) y permiten el mantenimiento del cultivo y la obtención de perfiles metabólicos similares al cultivo control.

Estas observaciones confirman que la inhibición del crecimiento presentada por los cultivos a los que se agregó GlcNAc se debe a un efecto específico de esta hexosamina (probablemente el aumento del *pool* intracelular de UDP-GNAc), y no a la intoxicación por la acumulación de amonio en el sobrenadante, ya que éste se mantuvo siempre por debajo del umbral de tolerancia establecido anteriormente.

El perfil del consumo de glucosa fue similar para los cultivos con 0 , 1,5 y 4 mM NH₄Cl, a pesar del deficiente crecimiento de este último. El cultivo con 2,5 mM NH₄Cl

presentó una mayor velocidad de consumo de glucosa, a pesar de haber alcanzado una densidad celular similar a la de las primeras dos suspensiones mencionadas. La correlación entre la cantidad de glucosa consumida al final del cultivo y la proporción de células metabólicamente activas (medida a través de la ICV), denominada $Y_{\text{cél/glc}}$, muestra que a medida que se incrementa la concentración de amonio en el medio de cultivo la eficiencia metabólica de rendimiento de masa celular a partir de glucosa disminuye considerablemente (Tabla XXXVIII), necesiándose (teóricamente) el doble de glucosa en el cultivo con 4 mM NH_4Cl para obtener la misma proporción de células que en el cultivo control.

Tabla XXXVIII: Valores de rendimiento de masa celular a partir de glucosa ($Y_{\text{cél/glc}}$), expresados en unidades de 10^8 células producidas por mmol de glucosa consumida durante los 6 días de cultivo.

NH_4Cl	$Y_{\text{cél/glc}}$	$Y_{\text{lac/glc}}$
0 mM	14,9	1,8±0,6
1,5 mM	12,7	2,1±0,6
2,5 mM	11,1	2,0±0,5
4 mM	7,1	1,3±0,2

En experimentos similares a los presentados anteriormente, Yang y Butler (2000a) determinaron que la adición de 20 mM de NH_4Cl ocasiona una reducción del 25% en el crecimiento celular de una línea recombinante de células CHO productoras de rhEPO. Esto confirma que las diferentes líneas celulares pueden ser adaptadas para desarrollar una alta tolerancia al amonio y crecer en muy altas concentraciones de este ion (Ryll y col., 1994).

Los valores de q_{lac} se condicen con la observación anterior, verificándose una mayor producción volumétrica de lactato en los cultivos a los que se adicionó la sal de amonio con respecto al cultivo control. Los rendimientos de glucosa en lactato se encontraron dentro del rango normalmente obtenido.

Con respecto a la velocidad específica de producción de rhEPO, todos los cultivos presentaron valores similares. Se han publicado resultados dispares sobre el efecto del amonio sobre la velocidad específica de producción de diferentes proteínas, todas ellas producidas en células CHO: en tanto Borys y col. (1994) observaron una disminución en la velocidad específica de producción del lactógeno-I murino al aumentar el contenido de NH_4Cl , Andersen y Goochee (1995) determinaron un aumento en este parámetro para el G-CSF, al igual que Yang y Butler (2000a) para la rhEPO. Estos resultados no hacen más que resaltar la variabilidad existente entre diferentes líneas de células CHO, y la necesidad de estudiar cada clon productor en sus condiciones de trabajo para poder validar las

conclusiones obtenidas. Al transcurrir el tiempo de cultivo, la cinética de producción de la proteína de los cultivos con y sin NH_4Cl se modificó en forma diferente para cada caso particular, obteniéndose la concentración más alta de rhEPO en el sobrenadante del cultivo control.

Excepcionalmente, se verificó una disminución en la concentración de rhEPO al final de los cultivos suplementados con amonio. La degradación de esta molécula al final de los cultivos en modo *batch* ya ha sido previamente descrita: Yoon y col. (2005) observaron este fenómeno en cultivos mantenidos a la temperatura de 37°C , y no a la de $32,5^\circ\text{C}$, adjudicándolo a la mayor actividad de las proteasas a aquella temperatura. Yang y Butler (2000a) no verificaron la degradación de la rhEPO producida por células CHO en cultivos en los que se adicionó hasta $40\text{ mM NH}_4\text{Cl}$, mediante electroforesis bidimensional de la proteína deglicosilada. Asimismo, utilizando esta misma técnica en un trabajo posterior (Yang y Butler, 2000b), los autores reportaron un efecto protector frente a la degradación proteolítica ocasionado aparentemente por la presencia de 20 mM de glutamina (la que generó una acumulación de amonio superior a 6 mM en el medio de cultivo) en cultivos en modo *batch*, lo que confirmaría sus resultados anteriores referidos a la falta de degradación de la rhEPO frente a altas concentraciones de amonio. Estos autores, sin embargo, no fueron capaces de reproducir estos resultados en cultivos tipo *fed-batch* alimentados con glutamina.

Las experiencias presentadas en este trabajo indicarían que una alta concentración de amonio en el medio extracelular del clon B1A2 afecta su metabolismo induciendo una mayor actividad proteásica, que se refleja en una disminución en la productividad volumétrica de rhEPO al final del cultivo. Debido a que el anticuerpo monoclonal MAb2B2 utilizado en el ensayo de ELISA reconoce tanto la forma glicosilada como no glicosilada de la rhEPO (Amadeo y col., 2004), no puede considerarse que la reducción en la concentración detectada de esta molécula se deba a variaciones en su glicosilación ocasionadas por glicosidasas y/o sialidasas liberadas al medio de cultivo.

El perfil de isoformas producidas en los cultivos adicionados con diferentes concentraciones de NH_4Cl se estudió por isoelectroenfocado seguido de *Western blot*. Posteriormente, la proporción de cada isoforma fue determinada realizando la densitometría de las bandas reveladas inmunoquímicamente (Tabla XXXIX). Se observó así que la proporción de glicofomas de mayor contenido de ácido siálico disminuye a medida que se incrementa la concentración inicial de amonio en el medio, hasta no detectarse las isoformas ácidas 6 y 7 en el cultivo con $4\text{ mM NH}_4\text{Cl}$.

Tabla XXXIX: Proporción relativa de las isoformas de rhEPO producidas por el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de NH₄Cl.

Isoforma	Control	1,5 mM	2,5 mM	4 mM
-3	8,4	8,3	10,5	9,7
-2	2,8	0,9	1,8	0,9
-1	9,8	8,3	7,4	23,5
0	11,0	19,9	22,0	24,1
1	14,2	10,8	11,0	17,5
2	14,2	11,1	11,5	10,2
3	11,1	10,6	11,2	8,4
4	9,1	13,8	8,3	4,1
5	7,6	10,1	10,2	0,3
6	7,1	4,2	4,8	ND
7	5,3	2,4	2,0	ND
8	ND	ND	ND	ND

Este hecho es de gran importancia debido a que, como se demostró anteriormente, 1,5 - 2,5 mM son concentraciones que pueden alcanzarse ya en el medio de cultivo antes de ser utilizado, cuando éste no es conservado apropiadamente. El amonio producido por el metabolismo celular se sumaría a la concentración inicial en el medio, generando un entorno de alta concentración del ion y afectando negativamente la calidad glicosídica de la molécula de rhEPO obtenida en estas condiciones. En tanto algunos autores sostienen que el efecto del amonio sobre la glicosilación de las proteínas se debería a variaciones en la actividad glicosiltransferasa/sialiltransferasa debido a alteraciones en el pH intracelular (Grammatikos y col., 1998; Borys y col., 1994; Maiorella, 1992), otros verificaron un efecto directo del amonio sobre el grado de sialidación de la glicoproteína (Yang y Butler, 2000a, 2000b).

Hasta aquí se ha analizado el efecto del agregado de diferentes componentes al medio de cultivo utilizado para cultivar el clon B1A2. No debe dejar de considerarse, sin embargo, que cuando se incorporan aditivos a un medio de cultivo para estudiar el efecto que estas moléculas tienen sobre las células, este agregado lleva a un incremento en la osmolalidad del medio, el cual – superados ciertos límites – podría afectar *per se* el metabolismo celular e interferir en los resultados de las experiencias.

Con el fin de estudiar la influencia que podría tener un aumento en la osmolalidad sobre el metabolismo del clon en estudio, y definir si esto pudo haber afectado los resultados anteriores (y futuros), se llevaron a cabo las experiencias que se describen a continuación.

5.4.6. Estudio del efecto de la osmolalidad sobre el crecimiento y la productividad celulares

5.4.6.1. Estudio del efecto de un medio de cultivo hiperosmolal sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2

Con el objeto de analizar el efecto que un medio hiperosmolal tendría sobre el metabolismo del clon B1A2, en una situación que imita lo que ocurre cuando se agregan otras especies al medio de cultivo, se prepararon cuatro medios a partir del medio SMIF 6, adicionándose las siguientes cantidades de NaCl:

- 0 mM NaCl (cultivo control)
- 10 mM NaCl
- 25 mM NaCl
- 50 mM NaCl

Partiendo de un cultivo en fase exponencial de crecimiento del clon B1A2 en suspensión en medio SMIF 6, sobre el cual se realizó el recuento de células viables, se tomaron cuatro alícuotas iguales, las cuales fueron centrifugadas 8 min a 200 *g*. Cada *pellet* fue resuspendido en 50 ml del medio apropiado, 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 contar las células. 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.

Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Fig. 32, en tanto los datos de velocidades específicas de consumo/producción de metabolitos y de $Y_{lac/glc}$ se presentan en las Tablas XL y XLI, respectivamente.

El parámetro más afectado por la adición de NaCl al cultivo fue la concentración máxima de células alcanzada: mientras que no se verificaron diferencias importantes entre el cultivo con 10 mM NaCl con respecto al cultivo control ($1,15 \times 10^6$ y $9,3 \times 10^5$ cél. viables ml⁻¹, respectivamente), los cultivos con 25 mM y 50 mM NaCl llegaron a una concentración celular máxima equivalente al 63% y 17% de la alcanzada por el cultivo control, respectivamente.

La velocidad específica de crecimiento se mantuvo constante durante todo el tiempo de cultivo, aunque su valor disminuyó en forma inversa al contenido de NaCl, en conformidad con datos previamente publicados (deZengotita y col., 2002b; Zhu y col., 2005).

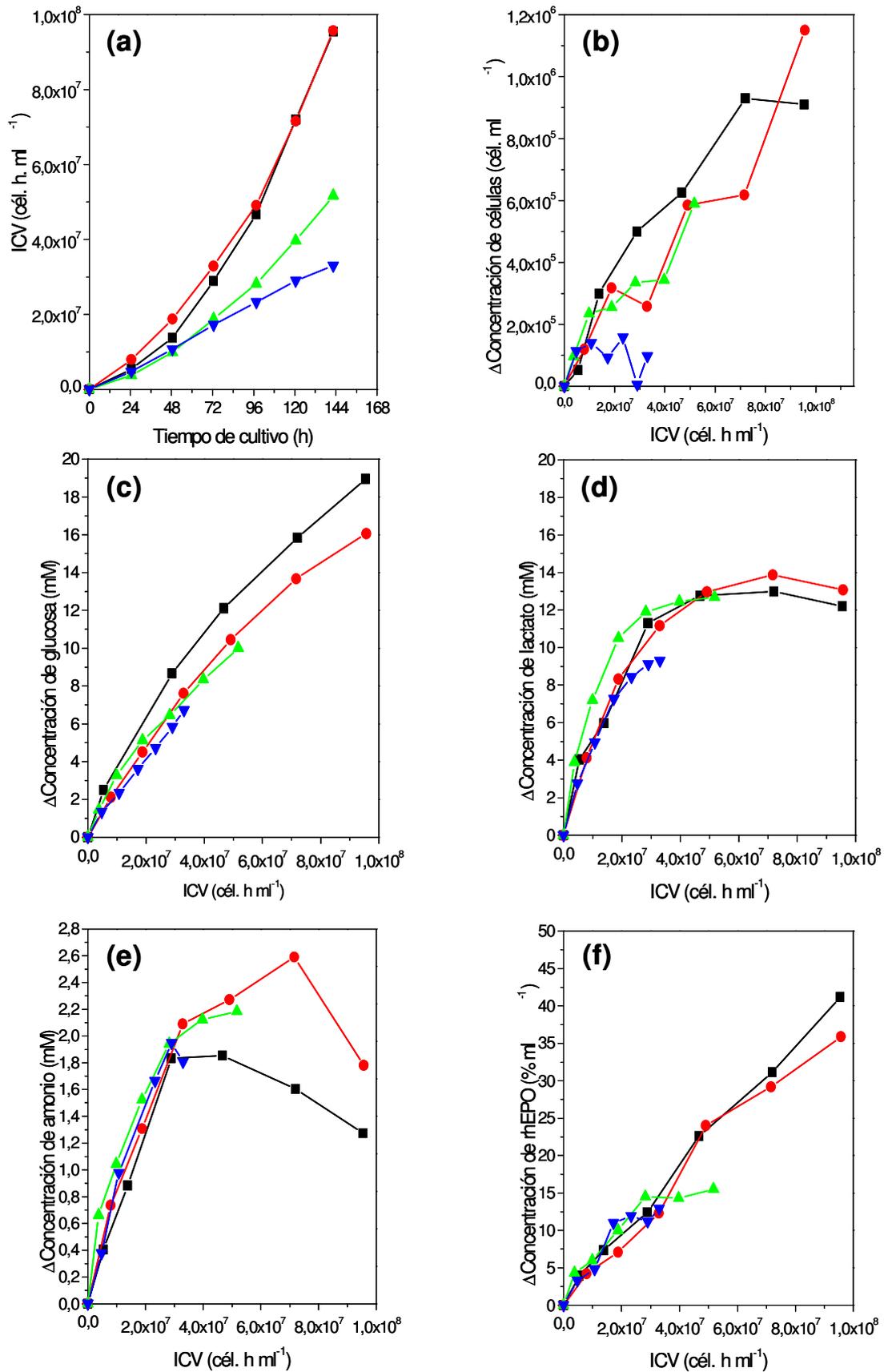


Fig. 32: Curvas de (a) ICV, (b) células, (c) glucosa, (d) lactato, (e) amonio y (f) rhEPO para el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio SMIF 6 adicionado con NaCl: (■) control sin NaCl, (●) 10 mM; (▲) 25 mM y (▼) 50 mM.

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

NaCl adicionado	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	0,013±0,001 <i>R=0,98</i> <i>P=0,0004</i>	195±17 <i>R=0,98</i> <i>P=0,0003</i>	367±48 <i>R=0,98</i> <i>P=0,0167</i>	63±1 <i>R=0,99</i> <i>P=0,0006</i>	0,424±0,012 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>
10 mM	0,011±0,001 <i>R=0,96</i> <i>P=0,0005</i>	169±12 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	336±49 <i>R=0,98</i> <i>P=0,021</i>	62±5 <i>R=0,99</i> <i>P=0,007</i>	0,387±0,026 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>
25 mM	0,009±0,001 <i>R=0,95</i> <i>P=0,0001</i>	195±12 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	535±85 <i>R=0,98</i> <i>P=0,024</i>	64±9 <i>R=0,97</i> <i>P=0,006</i>	0,477±0,045 <i>R=0,99</i> <i>P=0,002</i>
50 mM	0,013±0,005 <i>R=0,92</i> <i>P=0,258</i>	197±4 <i>R=0,99</i> <i>P<0,0001</i>	277±34 <i>R=0,96</i> <i>P=0,0005</i>	67±5 <i>R=0,99</i> <i>P=0,001</i>	0,387±0,061 <i>R=0,94</i> <i>P=0,002</i>

Tabla XLI: Valores de $Y_{lac/glc}$ calculados para los cultivos en suspensión del clon B1A2 en medio SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de NaCl.

NaCl adicionado	$Y_{lac/glc}$
0 mM	1,9±0,3
10 mM	2,0±0,3
25 mM	2,7±0,5
50 mM	1,4±0,2

La sensibilidad del clon B1A2 al aumento en la osmolalidad, sin embargo, parece ser mayor que la de otros clones de la línea celular CHO, ya que Yang y Butler (2000a) reportaron que la adición de 20 mM NaCl a un medio de cultivo libre de suero no tuvo efecto sobre la producción de células del clon por ellos estudiado. La excepción a esta observación es el cultivo con 50 mM NaCl, el cual presentó una μ del mismo orden que el cultivo control durante las primeras 48 h (siendo éste el valor que se indica en la Tabla XL).

Si se analizan los valores absolutos de concentración de células en la Fig. 32, se observa que los cuatro cultivos presentan pendientes similares durante las primeras 48 h de cultivo. La diferencia entre los valores de μ mostrados en la Tabla XL radica en que éstos son calculados a partir de la regresión realizada sobre la mayor cantidad de datos experimentales para los cuales se obtiene un $R \geq 0,95$. En el caso de los cultivos control, 10 mM y 25 mM NaCl se incluyeron todos los datos para el cálculo de μ , mientras que para el cultivo con 50 mM sólo se consideraron los datos de las primeras 48 h, debido a la posterior caída abrupta en la concentración de células viables. Es factible concluir entonces que cuando las células son sometidas a condiciones de estrés hiperosmótico, dentro del

rango de osmolalidad evaluado, sólo se observan efectos sobre el crecimiento después de las primeras 48 h de cultivo.

Los perfiles de consumo de glucosa fueron similares para todos los cultivos. Sin embargo, se observa un desplazamiento de las curvas de los cultivos con NaCl hacia valores inferiores de q_{glc} , resultado que sugiere un leve efecto de la osmolalidad sobre este parámetro. Los efectos de la osmolalidad sobre q_{glc} observados por distintos autores son relativamente variables: mientras que algunos resultados verificaron una leve tendencia al aumento de la q_{glc} en función de la osmolalidad (deZengotita y col., 2002b; Oh y col., 1995), otros no evidenciaron efecto alguno (Øyaas y col., 1994). Estas diferencias podrían ser explicadas en parte por el uso de diferentes medios de cultivo, ya que se ha establecido el impacto de éstos sobre el metabolismo de la glucosa bajo condiciones hiperosmóticas (Ryu y Lee, 1997).

Las curvas de producción de lactato, por otra parte, también fueron análogas entre los cultivos, si bien la suspensión suplementada con 25 mM NaCl presentó valores de q_{lac} más altos que el resto, lo que redundó en una menor eficiencia de utilización de la glucosa, obteniéndose un rendimiento $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ más alto para este cultivo (Tabla XLI).

No se verificaron grandes diferencias en los valores de q_{am} entre las suspensiones. En el cultivo control este parámetro se mantuvo constante durante las primeras 72 h, en tanto que para los cultivos de mayor osmolalidad el valor definido para q_{am} se extendió por un día más de cultivo. La mayor productividad volumétrica de NH_4^+ se verificó en el cultivo con 25 mM NaCl, aunque el valor alcanzado se encuentra dentro de lo esperado en un cultivo *batch*.

Se verificó así que la osmolalidad tiene un leve efecto, aunque opuesto, sobre q_{glc} y sobre la velocidad específica de producción de catabolitos (q_{lac} y q_{am}). El aumento de estos dos últimos coincide con lo observado por Zhu y col. (2005).

Con respecto al parámetro q_{rhEPO} , los valores obtenidos para los cuatro cultivos fueron muy similares, indicando que la osmolalidad no tiene un efecto significativo sobre la q_{rhEPO} . La variación en la concentración máxima alcanzada dependió entonces de las distintas concentraciones celulares obtenidas en cada caso.

Los valores de osmolalidad medidos durante el cultivo se incrementaron levemente durante las primeras 24 h, manteniéndose luego relativamente constantes (Fig. 33). El aumento en la osmolalidad a lo largo de todo el cultivo con respecto a su nivel inicial nunca superó el valor de 20 mOsm kg^{-1} .

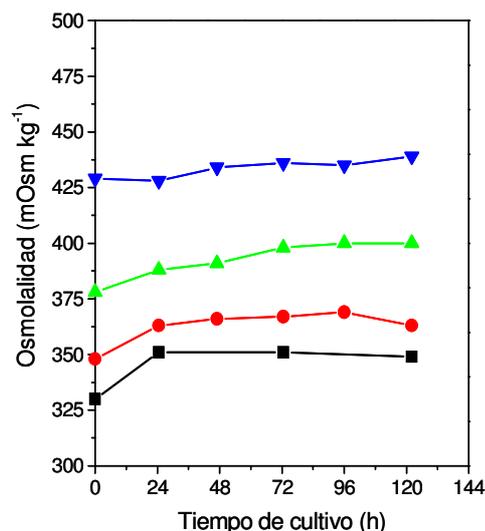


Fig. 33: Curvas de evolución de la osmolalidad en función del tiempo de cultivo para el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio SMIF 6 adicionado con NaCl: (■) control sin NaCl, (●) 10mM, (▲) 25mM y (▼) 50 mM.

Las muestras de los sobrenadantes de cultivo se analizaron por IEF seguido de *Western blot* y densitometría de las bandas. La proporción relativa porcentual de cada isoforma presente en las muestras estudiadas se resume en la Tabla XLII.

Tabla XLII: Proporción relativa de las isoformas de rhEPO producidas por el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio SMIF 6 adicionado con diferentes concentraciones de NaCl.

Isoforma	Control	10 mM NaCl	25 mM NaCl	50 mM NaCl
-3	0,1	0,1	0,4	0,1
-2	2,7	2,9	1,0	ND
-1	6,6	4,4	11,8	15,8
0	13,6	11,2	10,2	12,5
1	15,6	13,5	15,7	13,5
2	15,2	17,2	17,4	19,6
3	8,8	17,7	19,7	19,8
4	13,6	13,3	16,7	13,2
5	12,1	11,5	6,9	5,2
6	9,5	7,1	0,2	0,3
7	2,3	1,2	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND

Los datos experimentales muestran que a medida que aumenta el contenido de NaCl del medio de cultivo – y en consecuencia la osmolalidad – se verifica una disminución en el contenido de las isoformas de mayor contenido de ácido siálico, aún cuando no se observen diferencias significativas en los parámetros normalmente utilizados para caracterizar un cultivo. Ejemplo de esto es el cultivo al cual se adicionó 10 mM NaCl, el cual mostró un crecimiento muy similar al cultivo control, y sin embargo, se verifica una redistribución de la proporción de isoformas, disminuyendo la cantidad de las más ácidas, e incrementándose la de glicofomas con menor contenido de ácido siálico. Estos resultados discrepan con lo previamente informado por Yang y Butler (2000a), quienes observaron que el patrón de glicosilación de la rhEPO obtenido en cultivos suplementados con 40 mM NaCl no presentó diferencias con respecto al cultivo control. Es posible que la causa de esta variabilidad en el comportamiento observada radique en la utilización de un clon diferente, el cual – debido a su historia previa – pudo ser adaptado al crecimiento en condiciones de alta osmolalidad.

Considerando la poca variabilidad observada en la osmolalidad durante el tiempo de cultivo, resulta evidente la necesidad de controlar esta variable en el medio de cultivo a utilizar, por su directa influencia sobre la calidad glicosídica de la molécula de rhEPO producida.

A la luz de los resultados obtenidos al estudiar el efecto del aumento de la osmolalidad sobre los parámetros metabólicos del clon B1A2, es posible obtener algunas conclusiones sobre el efecto del agregado de GlcNAc al cultivo del clon, descrito en experiencias anteriores.

De acuerdo con lo observado, la adición de 20 mM GlcNAc tendría entonces un efecto similar - desde el punto de vista del aumento de especies con efecto osmótico - al agregado de 10 mM NaCl. En este caso, como se vio, el efecto de la osmolalidad es prácticamente nulo sobre las velocidades específicas de consumo/producción, en tanto se verifica como negativo sobre la calidad glicosídica de la molécula de rhEPO secretada.

Estos resultados indican que los efectos observados durante los cultivos realizados agregando este aminoazúcar al medio sólo podrían ser atribuidos específicamente a la presencia de esta molécula. En el caso particular del agregado de 20 mM GlcNAc al cultivo, y desde el punto de vista de su influencia sobre el patrón de glicosilación de la rhEPO, no es posible separar el efecto del aminoazúcar usado en esta concentración y el efecto del incremento en la osmolalidad ocasionado por el agregado de esta especie al medio.

5.4.6.2. Estudio del efecto de un medio de cultivo hipoosmolal sobre el crecimiento y la productividad del clon B1A2

Habiéndose establecido que un incremento en la osmolalidad del medio de cultivo puede afectar negativamente el patrón de glicofomas de rhEPO producido por el clon B1A2, se procedió a evaluar el efecto que un medio de cultivo de osmolalidad menor a la estándar podría tener sobre el metabolismo de este clon.

Para ello se preparó un medio de cultivo de composición similar a la del medio SMIF 6 pero sin el agregado de NaCl, al cual se llamó medio Zell-C1. Este medio de cultivo fue suplementado con las siguientes cantidades de NaCl, para dar origen a siete medios de cultivo de osmolalidad creciente (Tabla XLIII):

Tabla XLIII: Clasificación de los medios de cultivo obtenidos al adicionar diferentes concentraciones de NaCl al medio Zell-C1 (referencia: medio SMIF 6).

Concentración de NaCl	Condición del medio
60 mM	Hipoosmolal
80 mM	Hipoosmolal
90 mM	Hipoosmolal
100 mM	Hipoosmolal
120 mM	Hipoosmolal
150 mM	Hiperosmolal
180 mM	Hiperosmolal

Se determinó entonces la osmolalidad inicial de los medios de cultivo a ser utilizados durante la experiencia, por duplicado. Como puede observarse en la Fig. 34, la tasa de variación de osmolalidad del medio de cultivo empleado en función de la cantidad de NaCl agregada se mantuvo aproximadamente constante en un valor de $1,94 \text{ mOsm kg}^{-1}$ por mmol de NaCl agregado a un litro de solución ($R=0,99$). Este valor era esperado, debido a la atracción mutua existente entre los iones ya comentada previamente en la Introducción de este trabajo de tesis. A partir de este gráfico se obtuvieron los valores de osmolalidad asociados a los medios de cultivo utilizados, libres de células (Tabla XLIV).

Todos los cultivos - salvo para el medio SMIF 6 y para el medio suplementado con NaCl 90 mM - se realizaron por duplicado, indicados en la Fig. 35 y en la Tabla LXV como "a" y "b". Se partió de una suspensión madre del clon B1A2 en fase exponencial de crecimiento en medio SMIF 6. Un volumen apropiado de esta suspensión fue centrifugado

durante 8 min a 200 g; los *pellets* fueron resuspendidos en cada uno de los medios indicados y los cultivos mantenidos a 37°C en estufa gaseada. Paralelamente se realizó un cultivo en medio SMIF 6 comercial, con fines comparativos, siendo la osmolalidad de este medio aproximadamente 330±5 mOsm kg⁻¹.

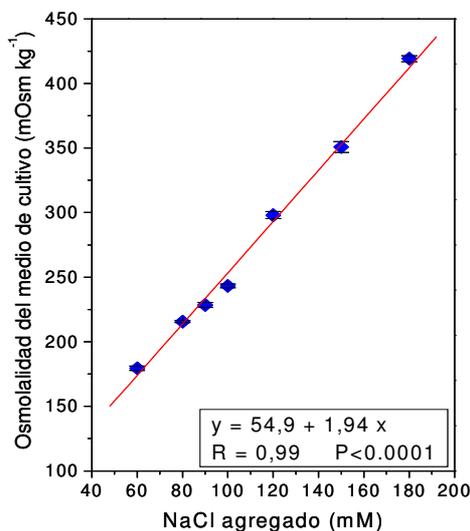


Fig. 34: Tasa de variación de osmolalidad del medio de cultivo empleado en función de la cantidad de NaCl agregada al medio de cultivo Zell C1.

Tabla XLIV: Valores de osmolalidad de los medios de cultivos generados a partir de la adición de diferentes concentraciones de NaCl al medio Zell-C1.

Concentración de NaCl	Osmolalidad del medio
60 mM	179 mOsm kg ⁻¹
80 mM	216 mOsm kg ⁻¹
90 mM	228 mOsm kg ⁻¹
100 mM	243 mOsm kg ⁻¹
120 mM	298 mOsm kg ⁻¹
150 mM	351 mOsm kg ⁻¹
180 mM	419 mOsm kg ⁻¹

Las muestras recolectadas diariamente se usaron para realizar el recuento de células y determinar la concentración de metabolitos en sobrenadante de cultivo. Con los datos experimentales se construyeron los gráficos de los parámetros metabólicos (Fig. 35), y del análisis de estas curvas se obtuvieron los valores de velocidad específica de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en las diferentes condiciones ensayadas que se resumen en la Tabla XLV.

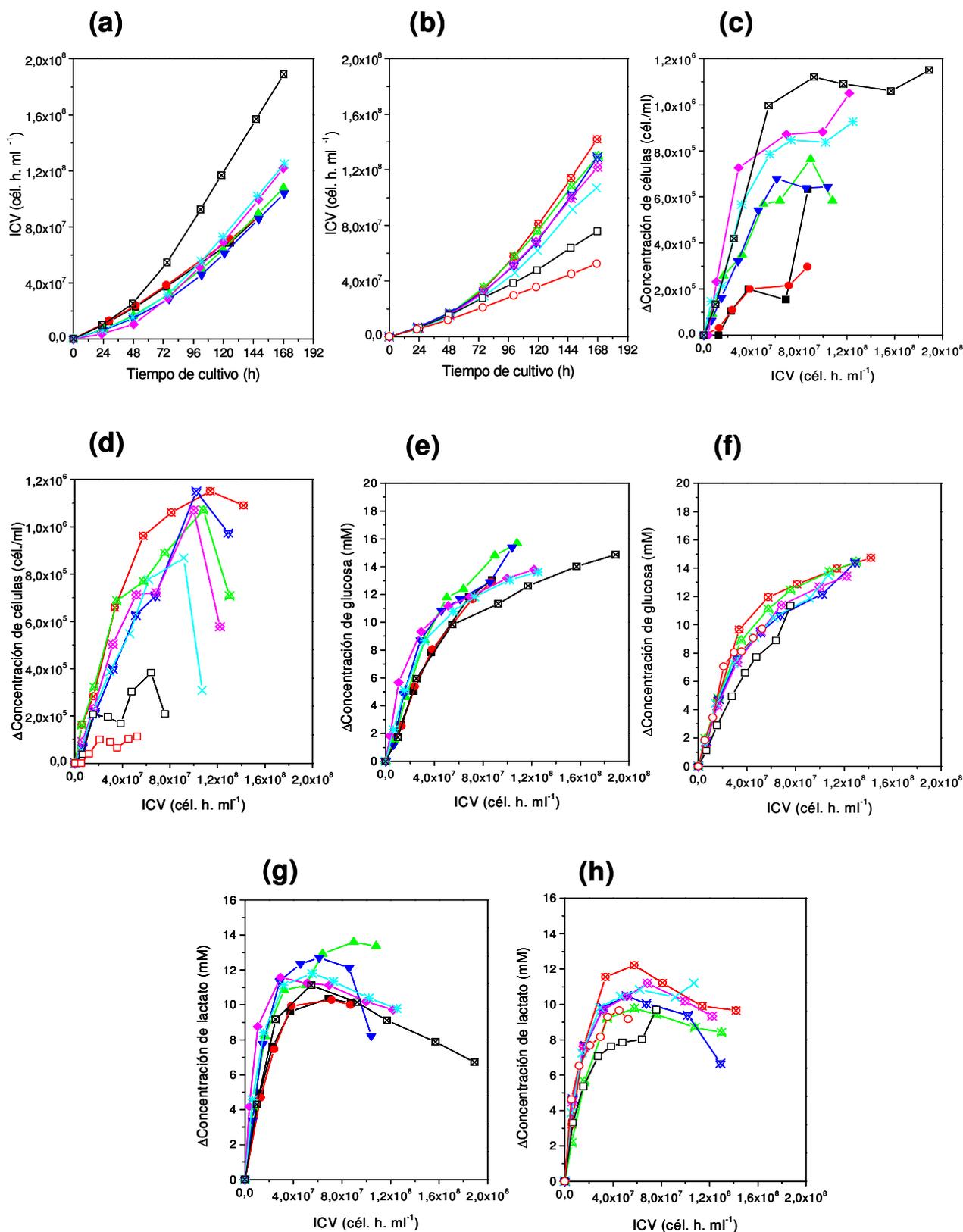


Fig. 35: Curvas de (a) y (b) ICV; (c) y (d) células; (e) y (f) glucosa; (g) y (h) lactato para el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio Zell C1 adicionado con diferentes concentraciones de NaCl y en SMIF 6: (■) 180 mM a, (●) 180 mM b, (▲) 150 mM a, (▼) 150 mM b, (◆) 120 mM a, (✕) 120 mM b, (⊠) SMIF 6, (⊗) 100 mM a, (△) 100 mM b, (▽) 90 mM, (◇) 80 mM a, (×) 80 mM b, (□) 60 mM a y (○) 60 mM b.

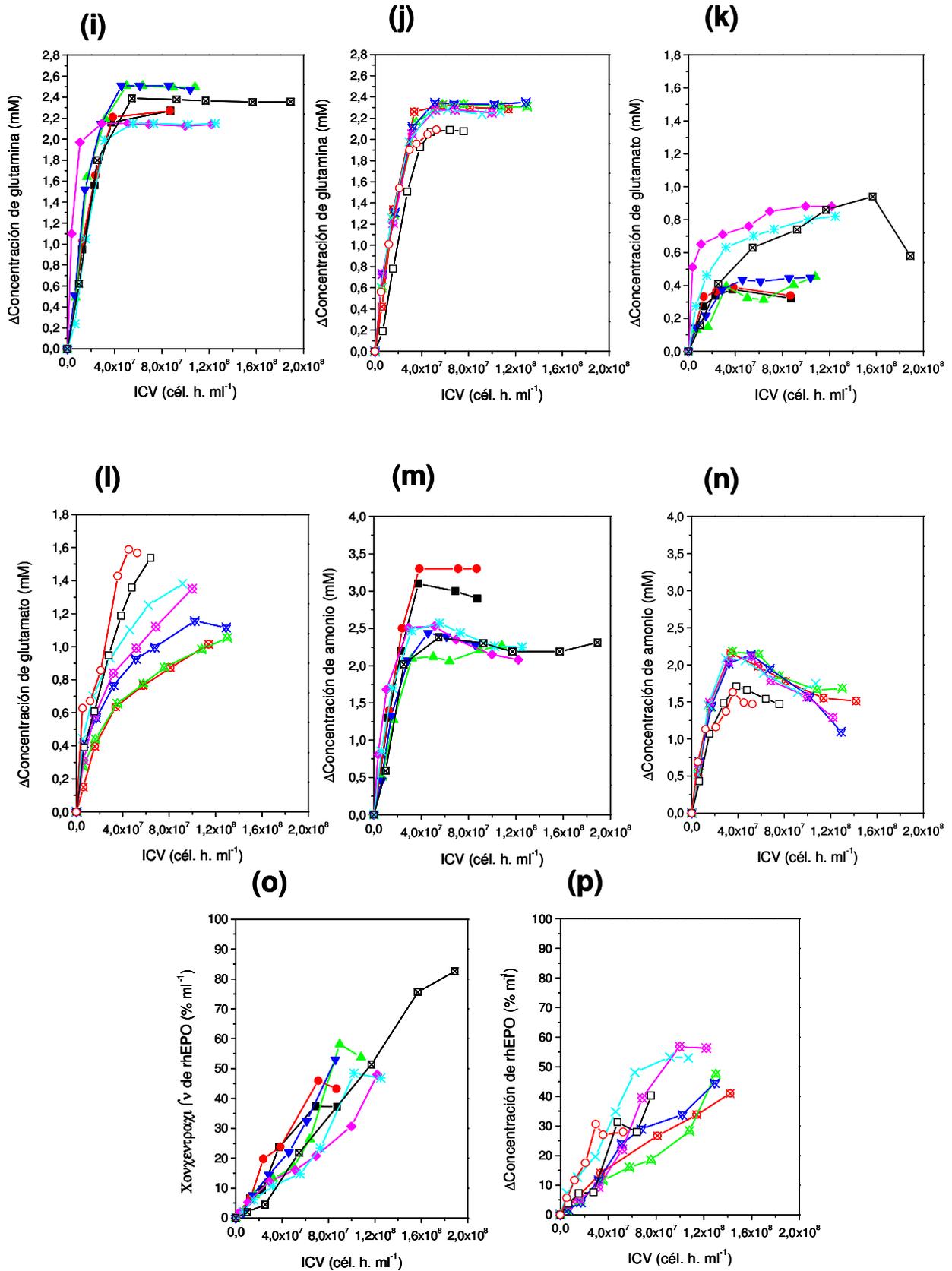


Fig. 35 (cont.): Curvas de (i) y (j) glutamina, (k) y (l) glutamato; (m) y (n) amonio; (o) y (p) rhEPO para el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio Zell-C1 adiccionado con diferentes concentraciones de NaCl y en SMIF 6: (■) 180 mM a, (●) 180 mM b, (▲) 150 mM a, (▼) 150 mM b, (◆) 120 mM a, (⋈) 120 mM b, (⊠) SMIF6, (⊗) 100 mM a, (△) 100mMb, (▽) 90 mM, (◇) 80 mM a, (X) 80 mM b, (□) 60 mM a y (○) 60 mM b.

Tabla XLV: Parámetros metabólicos específicos para los cultivos en suspensión del clon B1A2 en medio Zell-C1 adicionado con diferentes concentraciones de NaCl, y en medio SMIF 6.

NaCl (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_{gin} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{glu} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	q_{rhEPO} (% 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)
180 mM (a)	0,006±0,001 <i>R=0,95 P=0,052</i>	150±14 <i>R=0,98 P=0,0005</i>	254±45, <i>R=0,97 P=0,30</i>	83±7 <i>R=0,99 P=0,008</i>	57±6 <i>R=0,99 P=0,011</i>	15±5 <i>R=0,96 P=0,188</i>	0,463±0,057 <i>R=0,97 P=0,001</i>
180 mM (b)	0,0054±0,0007 <i>R=0,98 P=0,017</i>	147±14, <i>R=0,98 P=0,0005</i>	257±33, <i>R=0,98 P=0,016</i>	87±10 <i>R=0,99 P=0,012</i>	57±7 <i>R=0,98 P=0,015</i>	15±7 <i>R=0,92 P=0,255</i>	0,533±0,064 <i>R=0,97 P=0,001</i>
150 mM (a)	0,0109±0,0009 <i>R=0,99 P=0,001</i>	276±10, <i>R=0,99 P=0,001</i>	328±66 <i>R=0,96 P=0,039</i>	65±4 <i>R=0,99 P=0,005</i>	70±13 <i>R=0,97 P=0,031</i>	11±2 <i>R=0,97 P=0,028</i>	0,549±0,063 <i>R=0,96 P=0,0001</i>
150 mM (b)	0,0114±0,0003 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	249±30 <i>R=98 P=0,004</i>	395±51 <i>R=0,98 P=0,016</i>	54±9 <i>R=0,96 P=0,008</i>	77±11 <i>R=0,98 P=0,021</i>	12±2 <i>R=0,98 P=0,016</i>	0,601±0,034 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
120 mM (a)	0,026±0,002 <i>R=0,99 P=0,006</i>	309±58 <i>R=0,97 P=0,033</i>	802±128 <i>R=0,99 P=0,101</i>	78±20 <i>R=0,94 P=0,060</i>	177±46 <i>R=0,97 P=0,160</i>	56±31 <i>R=0,90 P=0,320</i>	0,347±0,028 <i>R=0,98 P<0,0001</i>
120 mM (b)	0,017±0,002 <i>R=0,99 P=0,013</i>	269±22 <i>R=0,99 P=0,007</i>	331±79 <i>R=0,95 P=0,052</i>	75±13 <i>R=0,97 P=0,028</i>	65±5 <i>R=0,99 P=0,005</i>	29±6 <i>R=0,98 P=0,137</i>	0,404±0,040 <i>R=0,97 P<0,0001</i>
100 mM (a)	0,017±0,001 <i>R=0,99 P=0,0005</i>	293±13 <i>R=0,99 P=0,002</i>	335±52 <i>R=0,98 P=0,024</i>	64±11 <i>R=0,97 P=0,027</i>	68±7 <i>R=0,99 P=0,009</i>	25±0,1 <i>R=0,99 P=0,003</i>	0,284±0,013 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
100 mM (b)	0,019±0,001 <i>R=0,99 P=0,003</i>	248±16 <i>R=0,99 P=0,004</i>	257±30 <i>R=0,99 P=0,013</i>	60±9 <i>R=0,98 P=0,023</i>	59±7 <i>R=0,99 P=0,014</i>	26±8, <i>R=0,95 P=0,201</i>	0,321±0,032 <i>R=0,97 P<0,0001</i>
90 mM	0,0111±0,0004 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	238±16 <i>R=0,99 P=0,005</i>	286±73 <i>R=0,94 P=0,060</i>	61±10 <i>R=0,97 P=0,023</i>	63±7 <i>R=0,99 P=0,012</i>	32±13 <i>R=0,93 P=0,248</i>	0,351±0,027 <i>R=0,98 P<0,0001</i>
80 mM (a)	0,0141±0,0007 <i>R=0,99 P=0,0003</i>	230±16 <i>R=0,99 P=0,005</i>	475±107 <i>R=0,98 P=0,142</i>	63±12 <i>R=0,97 P=0,033</i>	61±8 <i>R=0,98 P=0,016</i>	37±6 <i>R=0,99 P=0,101</i>	0,579±0,047 <i>R=0,98 P<0,0001</i>
80 mM (b)	0,0123±0,0004 <i>R=0,99 P<0,001</i>	252±24 <i>R=0,99 P=0,009</i>	494±90 <i>R=0,98 P=0,114</i>	72±11 <i>R=0,98 P=0,024</i>	66±8 <i>R=0,98 P=0,016</i>	47±14 <i>R=0,98 P=0,019</i>	0,608±0,082 <i>R=0,98 P=0,0001</i>
60 mM (a)	0,014±0,004 <i>R=0,96 P=0,169</i>	144±7 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	243±52 <i>R=0,96 P=0,042</i>	44±6 <i>R=0,97 P=0,005</i>	53±3 <i>R=0,99 P=0,0004</i>	32±4 <i>R=0,98 P=0,019</i>	0,523±0,066 <i>R=0,96 P=0,0005</i>
60 mM (b)	0,009±0,001 <i>R=0,96 P=0,036</i>	284±27 <i>R=0,99 P=0,002</i>	540±163 <i>R=0,96 P=0,186</i>	38±8 <i>R=0,92 P=0,010</i>	55±6 <i>R=0,98 P=0,0009</i>	36±15 <i>R=0,86 P=0,136</i>	0,979±0,082 <i>R=0,99 P=0,001</i>
SMIF 6	0,0185±0,0007 <i>R=0,99 P=0,002</i>	183±21 <i>R=0,99 P=0,013</i>	358±32 <i>R=0,99 P=0,56</i>	81±9 <i>R=0,99 P=0,070</i>	72±4 <i>R=0,99 P=0,033</i>	11±2 <i>R=0,98 P=0,020</i>	0,469±0,019 <i>R=0,99 P<0,0001</i>

Los datos de evolución de la osmolalidad durante el cultivo (graficados como el promedio de los duplicados de los cultivos) se muestran en la Fig. 36: se verificó así que ésta se mantuvo relativamente constante a lo largo de todo el cultivo, en forma similar a lo observado previamente para el caso de los cultivos en medio SMIF 6 adicionado con NaCl.

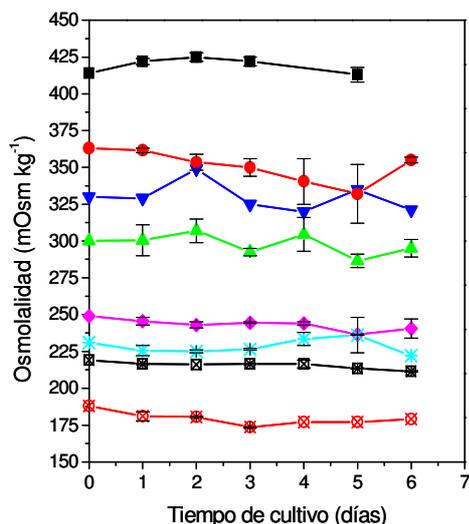


Fig. 36: Curvas de evolución de la osmolalidad en función del tiempo de cultivo para el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio Zell C1 adicionado con diferentes concentraciones de NaCl: (■) 180mM, (●) 150mM, (▲) 120mM, (▼) SMIF 6, (◆) 100mM, (✱) 90mM, (▣) 80mM y (⊗) 60mM.

Con el fin de establecer si existe una correlación entre la osmolalidad del medio de cultivo utilizado y los parámetros metabólicos analizados, se graficaron los valores promedio obtenidos para μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} en función de la osmolalidad (medida sobre el medio de cultivo libre de células, ver Tabla XLIV).

En la Fig. 37 se observa que los valores de velocidades específicas asociadas a cada valor de osmolalidad se distribuyen aproximadamente en forma de campana (μ , q_{glc} , q_{lac}) o linealmente (q_{gln} , q_{glu} , q_{am}).

Un gran número de fenómenos naturales – particularmente aquéllos que se ven influenciados por un gran número de factores, cada uno de los cuales interviene en pequeña medida – siguen una distribución en forma de campana. Debido a que en los procesos metabólicos que dan origen a los parámetros calculados intervienen en forma decisiva un gran número de actividades enzimáticas (cuyo comportamiento también sigue una distribución similar, dependiente de la temperatura, pH, etc.), es razonable pensar que las velocidades específicas derivadas de estas actividades también se distribuyan siguiendo

una curva de este tipo, llamada *curva de Gauss-Laplace* o simplemente *curva de Gauss*. En tanto, no resulta extraño tampoco que otros parámetros se relacionen en forma lineal con la osmolalidad. Para determinar el modelo al que responde cada variable, sin embargo, se procedió a ajustar los valores de acuerdo con un modelo lineal, un modelo gaussiano y un modelo polinómico cuadrático. La bondad del ajuste, estimada mediante el coeficiente de correlación R asociado a cada modelo, se presenta en la Tabla XLVI.

En particular, para el ajuste lineal de las variables q_{gln} , q_{glu} y q_{am} mostrados en la Fig. 37 no se consideró el valor correspondiente al cultivo de mayor osmolalidad ($419,2 \text{ mOsm kg}^{-1}$). En el caso de q_{gln} es probable que el bajo valor obtenido se deba en realidad al limitado crecimiento celular más que a un modelo diferente del lineal. Para el caso de q_{glu} y q_{am} , forzar un modelo gaussiano por causa de este último punto experimental no parece razonable, por varios motivos: en primer lugar, el resto de los valores experimentales se encuentra (aproximadamente) sobre una recta. En segundo lugar, nunca sería posible comprobar que el modelo gaussiano es el modelo real, ya que las células no sobreviven en condiciones de osmolalidad tan altas. Finalmente, si se tienen dos modelos que ajustan igualmente bien a un conjunto de datos, se trata siempre de elegir el modelo más simple (Spiegel, 1980).

Las variables μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} también se ajustaron de acuerdo con un polinomio de tercer grado, obteniéndose valores muy altos de R (datos no mostrados). Sin embargo, cuando el número de datos es muy pequeño frente al número de parámetros del modelo ajustado se llega a un *sobreajuste* del modelo, razón por la cual este ajuste no fue considerado en el análisis (el sobreajuste de modelos se comentará más adelante en la Sección 8 de este trabajo de tesis).

Tabla XLVI: Valores del coeficiente de correlación R obtenidos al ajustar diferentes modelos a los datos de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} calculados, en función de la osmolalidad del medio de cultivo.

Respuesta	Valor R del ajuste		
	Modelo lineal	Modelo gaussiano	Modelo cuadrático
μ	-0,18	0,96	-0,88
q_{glc}	-0,39	0,97	-0,98
q_{lac}	-0,55	0,82	0,86
q_{gln}	0,91	0,87	-0,90
q_{glu}	-0,97	0,99	0,95
q_{am}	0,89	0,81	-0,94
q_{rhEPO}	0,09	0,89	0,41

De esta manera se decidió ajustar los valores de μ , q_{glc} y q_{lac} a una curva gaussiana, y q_{gln} , q_{glu} y q_{am} a una recta (Fig. 37). En particular para el parámetro q_{rhEPO} se obtuvo un valor alto de R al ajustar un modelo gaussiano; sin embargo la distancia entre los puntos de inflexión de la curva en forma de campana es muy pequeña, como si existiese una gran variabilidad de los datos en un rango muy restringido de osmolalidad. Debido a la falta de datos experimentales en esta región que comprobasen esta aparentemente extrema sensibilidad de q_{rhEPO} con respecto a la osmolalidad del medio de cultivo, se consideró que esta variable no se ajusta a ninguno de los modelos propuestos, siendo probablemente más dependiente de otros factores (no determinados) que de la osmolalidad. Para exponer este análisis, en la Fig. 37 se incluye la curva de Gauss teórica propuesta por el ajuste. Los resultados mostrados en la Fig. 32(f), por otro lado, también indican que el valor q_{rhEPO} no varía en el rango de osmolalidad estudiado.

Las curvas gaussianas obtenidas responden a la siguiente ecuación:

$$y = y_0 + \frac{A}{s\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-x_c)^2}{2s^2}} \quad (23)$$

en donde:

y_0 = valor de y para $x = 0$

A = área bajo la curva

s = desviación estándar

x_c = valor de x para el cual $|y|$ es máximo

Las ecuaciones que definen la dependencia de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} y q_{am} con respecto a la osmolalidad del medio de cultivo (variable independiente X) y determinadas a partir del ajuste de las curvas presentadas en la Fig. 37 son las siguientes:

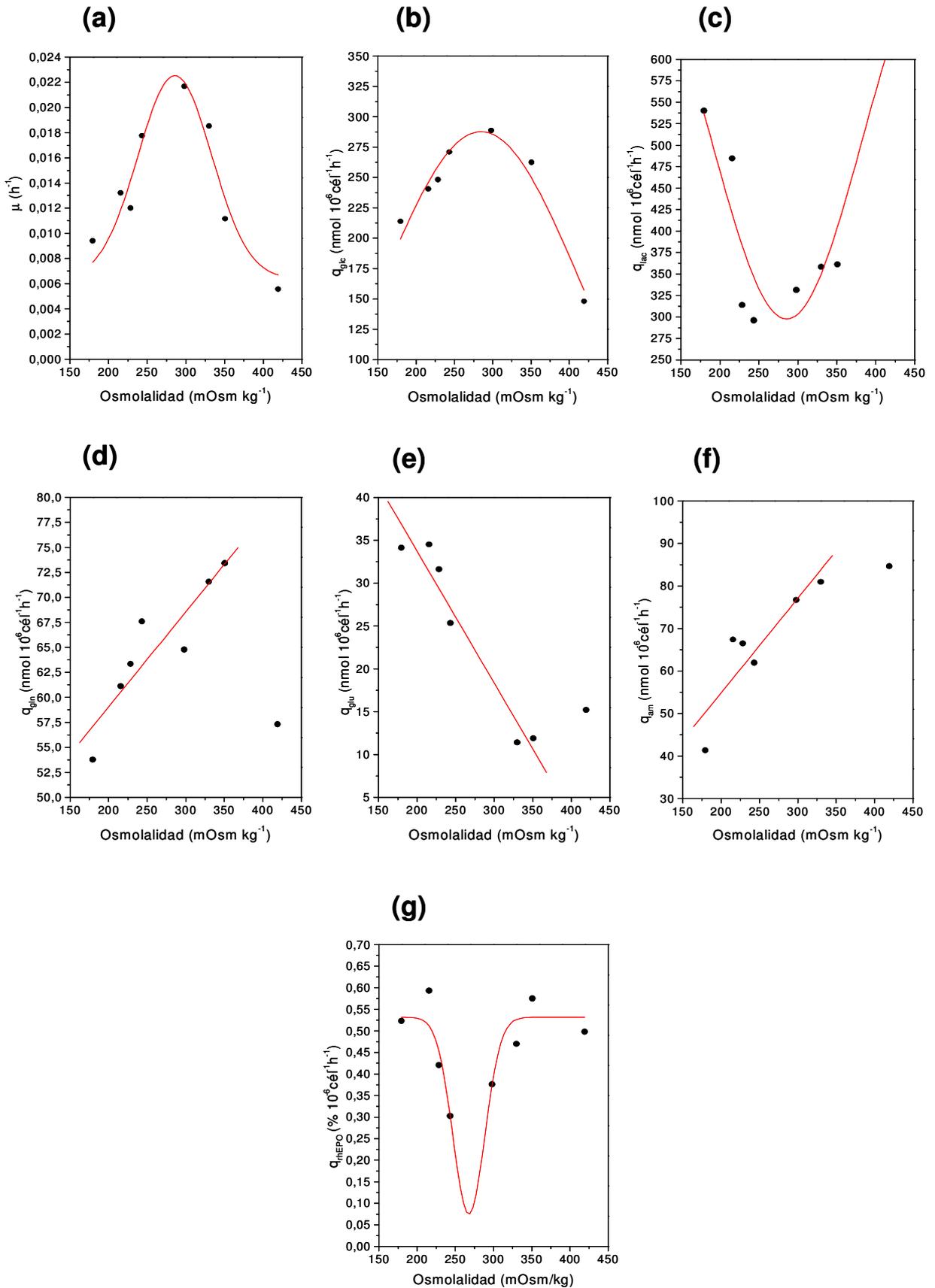


Fig. 37: Modelos ajustados para los datos de (a) μ , (b) q_{glc} , (c) q_{lac} , (d) q_{gln} , (e) q_{glu} , (f) q_{am} y (g) q_{rhEPO} en función de la osmolalidad del medio de cultivo.

- **Velocidad específica de crecimiento (μ):**

$$y = 0,00637 + \frac{1,93}{47,6\sqrt{2\Pi}} e^{-\frac{(x-285,7)^2}{2(47,6)^2}} \quad (24)$$

- **Velocidad específica de consumo de glucosa (q_{glc}):**

$$y = -22,4 + \frac{99,954,3}{128,5\sqrt{2\Pi}} e^{-\frac{(x-284,8)^2}{2(128,5)^2}} \quad (25)$$

- **Velocidad específica de producción de lactato (q_{lac}):**

$$y = 818,1 + \frac{(-124,797,2)}{95,6\sqrt{2\Pi}} e^{-\frac{(x-285,8)^2}{2(95,6)^2}} \quad (26)$$

- **Velocidad específica de consumo de glutamina (q_{gln}):**

$$y = 40,1 + 0,095x \quad (27)$$

- **Velocidad específica de producción de glutamato (q_{glu}):**

$$y = 64,5 - 0,154x \quad (28)$$

- **Velocidad específica de producción de amonio (q_{am}):**

$$y = 10,3 + 0,223x \quad (29)$$

La Fig. 37 muestra que los valores de velocidad específica de crecimiento presentan una distribución en forma de campana de Gauss, con su valor máximo correspondiente a un medio de cultivo de osmolalidad en el rango 286 ± 5 mOsm kg^{-1} . En forma similar, la velocidad específica de consumo de glucosa también tiene un máximo cercano a esos valores (285 ± 7 mOsm kg^{-1}), coincidiendo aproximadamente con el mínimo de la curva ajustada para q_{lac} (286 ± 12 mOsm kg^{-1}). Este hecho indica que en este rango de osmolalidad el clon B1A2 realiza el mejor aprovechamiento de la glucosa consumida,

destinándola a producir masa celular y minimizando así la generación de lactato.

Los valores de $Y_{lac/glc}$ y de $Y_{am/gln}$ se calcularon en base a las curvas ajustadas (datos no mostrados), verificándose que mientras la tasa de rendimiento de lactato a partir de glucosa también tiene forma de campana con un mínimo en $283 \pm 1 \text{ mOsm kg}^{-1}$, $Y_{am/gln}$ aumenta linealmente conforme se incrementa la osmolalidad del medio de cultivo usado.

Contrariamente a lo observado para el resto de los parámetros metabólicos, los valores de q_{rhEPO} se distribuyen siguiendo un patrón menos definido, encontrándose todos ellos dentro del rango $0,3 - 0,6 \% \cdot 10^{-6} \text{ cél}^{-1} \text{ h}^{-1}$ - a excepción del cultivo adicionado de 60 mM NaCl(b). La baja variabilidad entre los replicados de los cultivos (con la salvedad del cultivo mencionado) y la amplitud del rango de osmolalidad estudiado confirmaría las observaciones realizadas previamente acerca de que la variación en la osmolalidad del medio de cultivo no ejerce un efecto sustancial sobre la velocidad específica de producción de rhEPO.

Etcheverry y Ryll (1998) verificaron que un aumento en la productividad celular específica durante la fase de producción de la glicoproteína resulta en una disminución en el contenido de ácido siálico de la proteína madura. Recíprocamente, una disminución de la productividad celular específica induce un aumento en la cantidad de ácido siálico. Si bien en las experiencias realizadas en este trabajo no se estableció una correlación directa entre la osmolalidad del medio de cultivo y la velocidad específica de producción de rhEPO, se demostró en las experiencias descritas anteriormente que aquella sí influencia la glicosilación de las isoformas producidas. El perfil de glicofomas de la proteína obtenido en los cultivos de diferente osmolalidad se analizó sometiendo las muestras de sobrenadante purificadas y concentradas por ultracentrifugación a IEF seguido de *Western blot*. Los porcentajes relativos de las glicofomas separadas se resumen en la Tabla XLVII.

Los resultados obtenidos confirmaron las observaciones realizadas con anterioridad en cultivos en medio SMIF 6 adicionado con diferentes cantidades de NaCl, que indicaban el efecto negativo que tiene un incremento en la osmolalidad sobre el perfil de glicosilación de la rhEPO: en los cultivos hiperosmolales no fue posible observar la isoforma más ácida, mientras que se verificó un aumento en su contenido a medida que disminuía la osmolalidad.

Con el objeto de establecer la correlación verificada entre el perfil de isoformas producidas y la osmolalidad del entorno celular, se procedió a asociar un valor teórico de actividad biológica (AB_i) a cada muestra.

Tabla XLVII: Proporción relativa de las isoformas de rhEPO producidas por el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio Zell-C1 adicionado con diferentes concentraciones de NaCl, y en medio SMIF 6.

Cultivo	Isoforma (%)											
	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8
180 mM (a)	4,2	11,1	14,9	14,2	12,3	11,3	12,0	11,3	6,9	1,6	ND	ND
180 mM (b)	2,2	6,2	14,6	16,1	15,5	13,4	14,2	10,3	5,9	1,7	ND	ND
150 mM (a)	1,1	5,7	11,3	12,4	16,5	14,9	14,7	11,9	8,1	3,4	ND	ND
150 mM (b)	0,9	7,0	12,2	12,4	14,0	12,3	12,8	12,3	8,7	6,2	1,2	ND
120 mM (a)	1,3	4,6	9,9	12,4	13,3	12,2	13,9	13,5	11,0	6,8	1,1	ND
120 mM (b)	0,9	4,4	10,4	12,4	14,7	13,6	13,6	13,1	10,4	6,3	0,3	ND
100 mM (a)	1,1	8,8	12,8	12,6	13,4	11,8	12,4	11,6	8,5	5,9	1,2	ND
100 mM (b)	1,0	7,3	11,3	9,9	11,7	12,9	12,9	13,8	11,1	6,9	1,1	ND
90 mM	0,5	8,2	9,1	10,1	10,6	11,9	14,9	14,7	12,9	6,8	0,4	ND
80 mM (a)	1,3	7,1	11,4	11,9	11,3	11,1	14,3	17,4	10,8	2,8	0,6	ND
80 mM (b)	2,0	8,3	9,9	13,2	12,6	10,6	12,0	13,7	10,1	6,2	1,3	ND
60 mM (a)	0,5	8,3	9,3	10,3	13,0	10,4	10,8	13,3	12,2	8,2	3,4	0,2
60 mM (b)	6,0	14,2	15,5	11,3	9,9	8,8	8,9	9,5	8,9	6,3	2,7	0,1
SMIF6	1,2	9,9	12,9	14,5	12,9	12,2	11,1	10,1	9,6	5,4	0,1	ND

Para esto, debe conocerse la proporción relativa (P_i) de cada isoforma i presente en la mezcla de n isoformas de rhEPO, así como la actividad biológica específica de cada isoforma (AB_i). La actividad biológica específica estimada de la muestra de rhEPO (AB_t) se obtiene de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$AB_t = \sum_i^n (AB_i \times P_i) \quad (30)$$

En primer lugar, se definieron las proporciones relativas de cada isoforma, para

cada muestra. Teniendo en cuenta que la *European Pharmacopoeia* (2007) permite un máximo de ocho isoformas (isoformas con 7 – 14 moléculas de ácido siálico por molécula de proteína) en la formulación final de rhEPO, y que las isoformas de menor contenido de ácido siálico tienen asociada una actividad eritropoyética prácticamente nula – además de ser eliminadas en los pasos tempranos del proceso de purificación – éstas no fueron incluidas en el cálculo de la AB_i . Al descartar estas isoformas, fue necesario recalcular el porcentaje relativo de cada banda de manera que la suma de sus proporciones continuara siendo 100%.

En nuestro laboratorio se han obtenido varios lotes de solución concentrada de rhEPO que cumplen con la *European Pharmacopoeia* (2007). Para cada uno de ellos se ha determinado la potencia mediante el ensayo de valoración biológica realizado en ratones normocitémicos y el perfil de isoformas (resultados no mostrados). Considerando los valores de actividad biológica específica de cada isoforma de EPO informados por Strickland (1994), y aplicando un método iterativo, se ajustaron los valores de AB_i correspondientes al perfil de isoformas de los lotes obtenidos, de manera tal que la AB_i calculada coincida con la actividad biológica específica medida experimentalmente. Los valores de AB_i así calculados para las isoformas de rhEPO producidas en nuestro laboratorio se resumen en la Tabla XLVIII (Amadeo, 2003):

Tabla XLVIII: Actividad biológica específica teórica de las isoformas de rhEPO.

Isoforma	AB_i (UI mg^{-1})
1	30.622
2	42.980
3	58.809
4	103.676
5	155.727
6	157.310
7	157.493
8	225.288

Se obtuvo entonces el valor de AB_i calculado a partir del conjunto de isoformas de rhEPO producidas en cada cultivo. Los gráficos de estos valores en función de la osmolalidad del medio de cultivo se presentan en la Fig. 38.

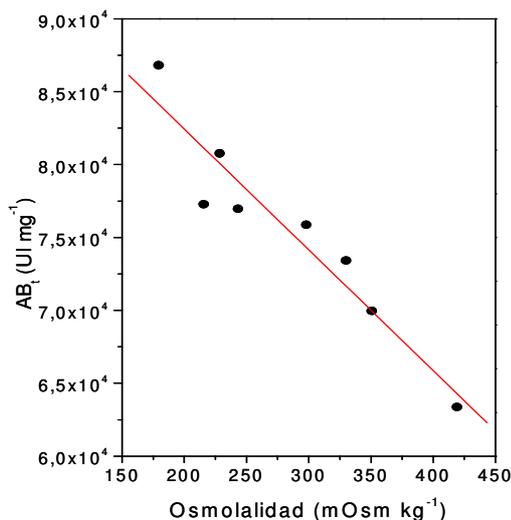


Fig. 38: Valores de AB_t calculados a partir del conjunto de isoformas 1 a 8 producidas por el clon B1A2 cultivado en suspensión en medio Zell-C1 adicionado con diferentes concentraciones de NaCl, y en medio SMIF 6.

Como puede observarse, la actividad biológica teórica se incrementa en forma lineal ($R=0,95$; $P=0,0003$) a medida que disminuye la osmolalidad del medio de cultivo. Los datos experimentales fueron ajustados realizando una regresión lineal definida por la ecuación:

$$y = 98.984,8 - 82,8x \quad (31)$$

De esta manera fue posible estimar que la AB_t para el cultivo en medio con 60 mM NaCl fue un 18% superior a la obtenida en el medio de cultivo comercial SMIF 6.

Se procedió entonces a establecer si la diferencia observada entre las medias de los tratamientos (considerando como tratamientos los cultivos con diferentes concentraciones de NaCl) era estadísticamente significativa, para lo cual se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, utilizando el software SIGMA.STAT® v2.01 (Jandel Scientific, EE.UU.). Los resultados de este análisis se presentan en el Anexo 1.

El ANOVA realizado indicó que las diferencias entre los valores de las medias entre los tratamientos fueron mayores a las esperadas por la variabilidad interna; es decir, existe una diferencia estadísticamente significativa ($P=0,009$) entre las medias.

Debido a que se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se

realizó la comparación pareada entre las medias de los tratamientos, utilizando el método de *Mínima Diferencia de Cuadrados (Least Square Difference, LSD)* (Anexo 2). Este análisis demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de AB_7 obtenida de los cultivos con 60 mM NaCl y la media de todos los otros tratamientos estudiados, con excepción del cultivo (sin replicados) con 90 mM NaCl, siendo que en este caso el valor obtenido se encuentra muy cercano al valor crítico que establece la existencia de una diferencia significativa entre ambas medias.

Estos resultados confirman que la utilización de un medio de cultivo hipoosmolal permite obtener un conjunto de isoformas cuya actividad biológica - calculada en base a la proporción de cada isoforma presente – resulta *significativamente* superior a la obtenida en medios de osmolalidad estándar.

La mayor actividad biológica observada en el cultivo adicionado con 60 mM NaCl está asociada directamente a la menor osmolalidad de este cultivo. La relativamente baja acumulación de amonio en este sobrenadante probablemente contribuyó a la mejora del perfil de glicoformas, pero ésta no puede ser atribuida exclusivamente al nivel de amonio, ya que la concentración máxima alcanzada ($\approx 1,75$ mM) ya había sido previamente observada en otros cultivos (por ejemplo, el cultivo control de la experiencia de adición de NH_4Cl) en los que no se observó la presencia de la isoforma más acídica como en este caso.

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

Se procedió entonces a evaluar la capacidad de dos medios de cultivo hipoosmolales para mantener el crecimiento y la productividad celulares utilizando una estrategia de recambios parciales del sobrenadante de cultivo, en un proceso similar a una perfusión. El objetivo fue el establecer si la utilización de medio de cultivo de baja osmolalidad es factible para la producción de rhEPO en cultivos de alta densidad perfundidos.

En primer lugar se realizó una experiencia en modo *batch*, en la cual se partió de un cultivo del clon B1A2 en medio SMIF 6 en fase de crecimiento exponencial, el cual fue alicuotado y centrifugado 8 min a 200 *g*. Los *pellets* celulares fueron resuspendidos en una concentración inicial de 6×10^5 cél. viab. ml^{-1} , en medio de cultivo Zell-C1 adicionado de (a) 120 mM NaCl, (b) 80 mM NaCl y (c) 60 mM NaCl. Se realizó además un cultivo en medio SMIF 6 como control. La evolución de la concentración de células viables en los cultivos estudiados se muestra en la Fig. 39.

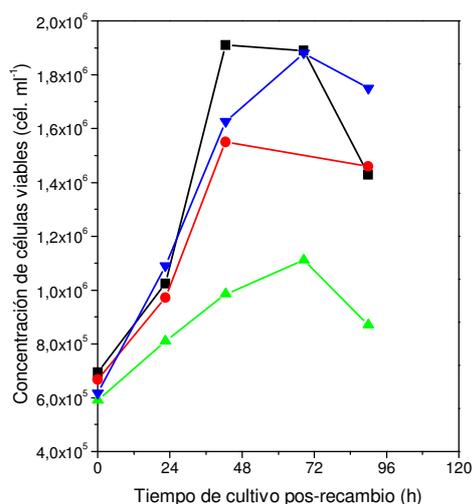


Fig. 39: Curva de concentración de células viables en los cultivos del clon B1A2 en medio Zell-C1 adicionado con (■) 120 mM, (●) 80 mM y (▲) 60 mM NaCl, utilizándose como cultivo control (▼) SMIF 6.

Puede observarse que en condiciones de hipoosmolalidad no se obtienen concentraciones celulares tan altas como en el cultivo control. En particular, la concentración máxima de células alcanzada en el cultivo con 60 mM NaCl fue un 40% inferior a la obtenida en el cultivo en SMIF 6, indicando que las mejores condiciones para la producción de moléculas de rhEPO de alta calidad glicosídica no son favorables para sostener el crecimiento de las células cuando éstas son cultivadas a alta densidad.

En una segunda experiencia se estudió el comportamiento de las células realizando sustituciones parciales del sobrenadante de cultivo por medio fresco, en forma similar a lo que ocurre durante un proceso de perfusión. En esta ocasión, a partir de un cultivo inicial del clon B1A2 en medio SMIF 6, se iniciaron tres cultivos de alta densidad en medio Zell-C1 adicionado de:

- 120 mM NaCl
- 80 mM NaCl
- 60 mM NaCl

La concentración inicial de estos cultivos fue de $1,3 \times 10^6$ células viables por ml, siendo el volumen inicial de cultivo 100 ml.

Se siguió un protocolo de progresivo aumento del volumen de recambio del sobrenadante de cultivo. Para ello, luego de la toma diaria de muestra, se procedió a retirar

el volumen a ser sustituido por medio fresco, el cual se centrifugó 8 min a 200 *g*. Luego, el *pellet* celular se resuspendió en igual volumen de medio fresco y se agregó al frasco de cultivo. El esquema de sustituciones realizado se resume según:

- Día 0: Inicio del cultivo
- Día 1: Recambio de 1/2 del volumen de trabajo
- Día 2 a día 7: Recambio de 2/3 del volumen de trabajo
- Día 8 a día 20: Recambio del total del volumen de trabajo

Los datos de viabilidad de los cultivos y de concentración de células viables, glucosa, lactato, amonio y rhEPO se presentan en la Fig. 40.

Durante las primeras 72 h se observó un aumento en la concentración de células viables en los cultivos suplementados con 120 mM y 80 mM de NaCl, acompañada por una disminución en la concentración de glucosa y una acumulación de lactato, amonio y rhEPO. A partir de ese momento la densidad celular disminuyó en tanto se mantuvieron relativamente constantes las concentraciones de glucosa (aún no completamente consumida) y los otros metabolitos. Al momento de iniciar el recambio del 100% del volumen de trabajo, los cultivos con 120 mM y 80 mM presentaron una ligera recuperación de la masa celular, alcanzando concentraciones levemente inferiores a la concentración celular inicial, y manteniéndose de esta forma hasta el final de la experiencia. La densidad de células en el cultivo con 60 mM NaCl continuó disminuyendo, por el contrario, hasta mantenerse constante en torno de $4\text{-}5 \times 10^5$ cél. viab. ml⁻¹, coherentemente con un incremento en la concentración de glucosa – lo que indicó un menor consumo – y una disminución en los niveles de rhEPO acumulados en el sobrenadante. En esta última fase de los cultivos, se verificaron además valores relativamente constantes en la concentración de los metabolitos restantes en todos los casos.

Esta experiencia confirmó que condiciones de muy baja osmolalidad son desfavorables para sostener el crecimiento de las células, a pesar de mejorar la glicosilación de la molécula de rhEPO, e inviables para ser utilizadas durante la producción industrial de esta proteína, dada la concentración obtenida. Sin embargo, los cultivos adicionados con NaCl 120 mM (298 mOsm kg⁻¹) y 80 mM (216 mOsm kg⁻¹) mostraron un comportamiento considerado aceptable y que alentó a continuar con su estudio.

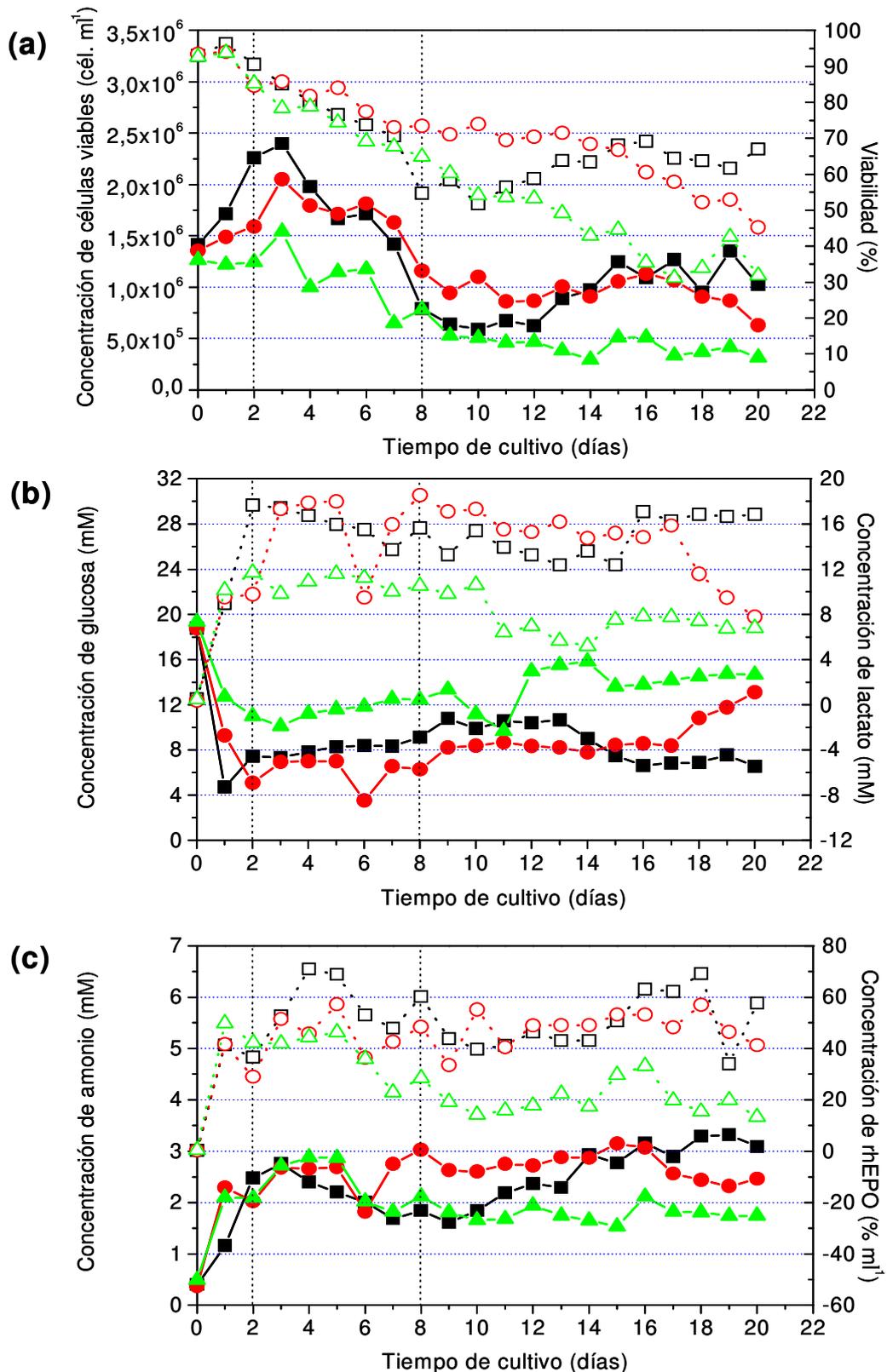


Fig. 40: Curvas de (a) concentración de células viables y viabilidad, (b) concentración de glucosa y lactato, y (c) concentración de amonio y rhEPO para el clon B1A2 cultivado en suspensión utilizando un protocolo de recambios del medio de cultivo. Para cada figura (a), (b) y (c) los símbolos (■) 120 mM, (●) 80 mM y (▲) 60 mM corresponden a la concentración de células viables, de glucosa y de amonio. Análogamente, los símbolos (□) 120 mM, (○) 80 mM y (△) 60 mM corresponden a la viabilidad, y a la concentración de lactato y de rhEPO, respectivamente.

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

Koll y col. (2000) comprobaron que mediante la manipulación del contenido de hidratos de carbono del medio de cultivo (conteniendo glutamina como principal fuente de energía) es posible modificar la calidad glicosídica de la molécula de rhEPO, producida en un sistema de cultivo por lote alimentado (*fed-batch*). Habiéndose establecido en las experiencias descritas que medios de cultivo hipoosmolales permiten obtener una mayor proporción de isoformas de rhEPO altamente glicosiladas, se procedió a estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono – en particular glucosa, galactosa y manosa – sobre el perfil de glicofomas producidas, cuando son adicionadas a un medio de cultivo con estas características.

Se realizó entonces una experiencia tipo *screening*, para obtener información *a priori* sobre la posibilidad de utilizar diferentes fuentes de carbono conjuntamente con un medio hipoosmolal en la producción de rhEPO. Para ello se formuló entonces un nuevo medio de cultivo, de igual composición que el medio Zell-C1 utilizado anteriormente, sólo que sin glucosa. A este medio le fue agregado 80 mM NaCl, resultando en un nuevo medio base denominado Zell-C2, al cual se adicionaron diferentes concentraciones de los tres azúcares, como se indica más adelante.

Para ello se llevó a cabo un diseño experimental de mezcla (*mixture experimental design*) en el cual se evaluaron tres variables correspondiente a las hexosas. En un diseño experimental de mezcla la suma de todos los componentes debe ser igual a una constante, habiéndose elegido este diseño con el fin de mantener constante la osmolalidad del cultivo, y así independizar los resultados de esta variable. La condición impuesta a esta mezcla fue que la suma de las concentraciones de los tres azúcares analizados fuese siempre constante e igual a 25 mM.

Las hexosas fueron evaluadas siguiendo un diseño *simplex lattice* {3,2} aumentado, el cual incluye el centroide y tres puntos axiales. Este diseño, al cual se denominó *diseño S1*, está constituido por 10 puntos, de los cuales 4 se encuentran en el interior del *simplex*, como se muestra en la Fig. 41. Este tipo de diseño experimental y las ventajas asociadas a su uso se explicarán en detalle en la sección 6 de esta tesis. Las diez combinaciones evaluadas simultáneamente consistieron en tres mezclas puras (100% de uno de los componentes, estas mezclas se realizaron por duplicado), tres mezclas binarias y cuatro mezclas ternarias.

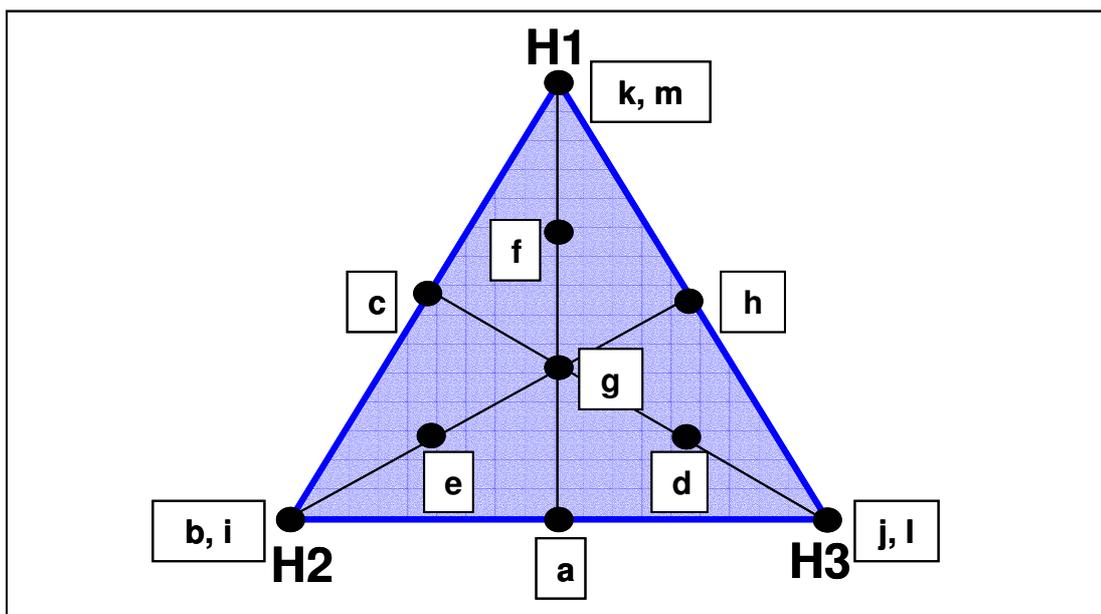


Fig. 41: Diseño S1: diseño experimental *simplex lattice* {3,2} aumentado, el cual incluye el centroide y tres puntos axiales.

Los diferentes cultivos se iniciaron a partir de una suspensión en fase de crecimiento exponencial del clon B1A2 en medio SMIF 6. Esta suspensión fue separada en alícuotas, las que fueron centrifugadas 8 min a 200 *g*. El *pellet* celular fue resuspendido en cada uno de los medios ensayados, en una concentración inicial de 2×10^5 cél. viables ml^{-1} , y diariamente fue retirada una muestra de cada cultivo, con el fin de realizar el recuento celular y posteriormente la determinación de la concentración de metabolitos. La curva de ICV en función del tiempo de cultivo, y la curva de producción acumulada de células en función de la ICV obtenidas en estas experiencias se presentan en la Fig. 42.

La composición de las mezclas estudiadas se resume en la Tabla XLIX. En esta tabla se indican además los valores de μ , y los valores *R* y *P* obtenidos al realizar la regresión lineal de los datos experimentales.

En los casos en que se utilizó galactosa como principal fuente de carbono se observó una inhibición del crecimiento celular, verificándose que las células inoculadas eran incapaces de sobrevivir en condiciones de hipoosmolalidad cuando esta hexosa es usada en alta proporción.

Los cultivos con alto contenido de manosa evolucionaron en forma similar a aquéllos en los que se utilizó mayoritariamente glucosa, obteniéndose valores de μ parecidos entre estos cultivos, aunque las concentraciones celulares máximas alcanzadas empleando manosa fueron inferiores.

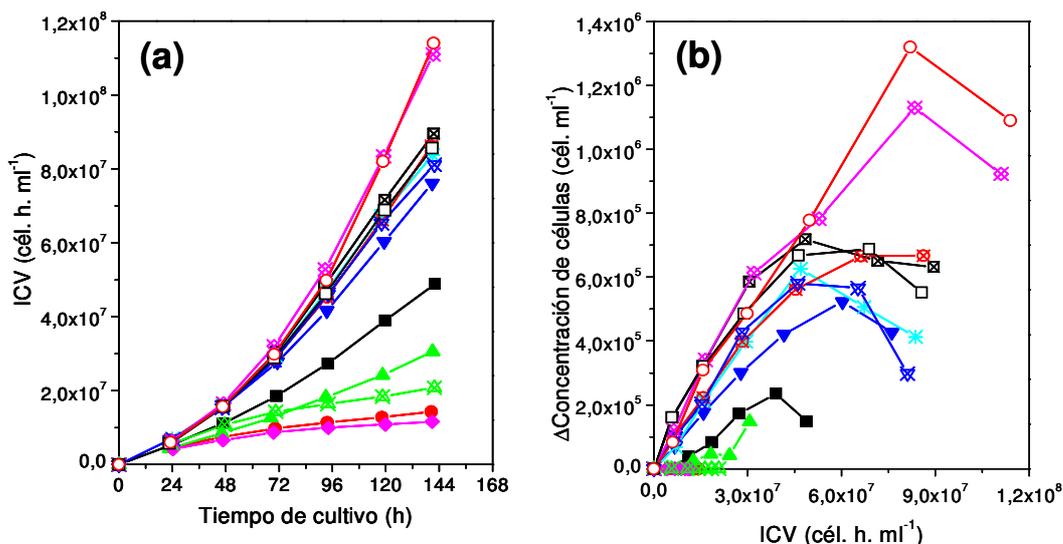


Fig. 42: Curvas de (a) ICV en función del tiempo de cultivo, y (b) de producción acumulada de células en función de la ICV obtenidas para el clon B1A2 cultivado en medio Zell-C2 utilizando glucosa, galactosa y/o manosa: (■)S1-a, (●)S1-b, (▲)S1-c, (▼)S1-d, (◆)S1-e, (✕)S1-f, (⊠)S1-g, (⊗)S1-h, (△)S1-i, (▽)S1-j, (◇)S1-k, (□)S1-l, (○)S1-m.

Tabla XLIX: Valores de μ obtenidos para los distintos puntos experimentales del diseño S1.

Cultivo	Glucosa (mM)	Galactosa (mM)	Manosa (mM)	μ (h^{-1})	R	P
S1-a	0,00	12,50	12,50	0,0066±0,0006	0,98	0,0003
S1-b	0,00	25,00	0,00	nd	nd	nd
S1-c	12,50	12,50	0,00	0,004±0,001	0,87	0,0104
S1-d	4,17	4,17	16,67	0,0089±0,0006	0,99	0,0001
S1-e	4,17	16,67	4,17	nd	nd	nd
S1-f	16,67	4,17	4,17	0,0136±0,0003	0,99	<0,0001
S1-g	8,33	8,33	8,33	0,015±0,002	0,98	0,003
S1-h	12,50	0,00	12,50	0,0124±0,0006	0,99	0,0003
S1-i	0,00	25,00	0,00	nd	nd	nd
S1-j	0,00	0,00	25,00	0,0129±0,0009	0,99	0,0008
S1-k	25,00	0,00	0,00	0,013±0,001	0,99	0,002
S1-l	0,00	0,00	25,00	0,0139±0,001	0,98	0,002
S1-m	25,00	0,00	0,00	0,0159±0,0004	0,99	<0,0001

Otros autores han observado que las células CHO muestran un crecimiento similar cuando se utilizan glucosa y manosa, como fuentes de carbono de los cultivos (Kurano y col., 1990; Altamirano y col., 2000)

Considerando que tal vez la suma de efectos del empleo de un medio hipoosmolal

y fuentes de carbono sub-óptimas resulta en un estrés excesivo para el normal crecimiento de las células se procedió a repetir el diseño experimental utilizado en la experiencia anterior, empleando esta vez como medio base Zell-C1 adicionado con 120 mM NaCl, en lugar de 80 mM. Este nuevo medio de cultivo se denominó Zell-C3.

Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores (datos no mostrados): en aquellos casos en los que se utilizó glucosa como fuente de carbono principal se mantuvieron las concentraciones celulares máximas y la velocidad específica de crecimiento de experiencias previas, mientras que cuando se empleó manosa no se verificaron mejoras en estos valores con respecto al medio Zell-C2. Basados en estas observaciones es posible concluir que el empleo de un medio de cultivo de baja osmolalidad demanda la utilización de una fuente de carbono rápidamente metabolizable para poder alcanzar altas densidades celulares.

Estos resultados, sin embargo, no permiten descartar la utilización de estas fuentes de carbono alternativas a la glucosa – las que podrían tener un efecto beneficioso sobre el patrón de glicosilación de la rhEPO – aunque son suficientes para confirmar la inviabilidad de la hipótesis de su utilización como únicos suplementos de un medio de cultivo hipoosmolal durante el proceso de producción de esta proteína.

5.5. CONCLUSIONES

- La adición de GlcNAc no tiene un efecto perceptible sobre los parámetros de crecimiento, hasta el nivel evaluado de 2 mM.
- Una concentración de GlcNAc de 20 mM resulta inhibitoria del crecimiento celular, si bien no puede descartarse un efecto conjunto de la osmolalidad, ocasionada por la alta concentración del aminoazúcar usada.
- El agregado de GlcNAc tiene un efecto negativo sobre el perfil de isoformas de rhEPO producido, ya que se verifica una disminución de las glicoformas más sializadas en la medida en que aumenta la concentración de GlcNAc en el medio, la que se debería específicamente al aminoazúcar. Este fenómeno podría estar asociado al aumento verificado en la síntesis del ion amonio.
- El efecto negativo de la GlcNAc sobre la glicosilación de la rhEPO es específico de este aminoazúcar, y no se debe exclusivamente al aumento de osmolalidad del medio causada por su adición, según se deduce al comparar las experiencias en las que se agregó GlcNAc y NaCl, respectivamente.

- En particular, en el cultivo con 20 mM GlcNAc se verificó la desaparición de la banda correspondiente a la isoforma de mayor sialidación, en tanto en el cultivo con 10 mM NaCl (de osmolalidad similar) se observó solamente una disminución en su proporción. La desaparición de la banda podría deberse a un efecto combinado entre la adición del aminoazúcar y el incremento de la osmolalidad causado por su adición.
- En los cultivos con 0,2 y 2 mM de GlcNAc se observó una influencia negativa de esta molécula sobre el contenido de isoformas ácidas, aún cuando el aumento en la osmolalidad resultara ínfimo.
- Se verificó un efecto desfavorable sobre los otros parámetros del cultivo cuando se adicionó 20 mM de GlcNAc, el que no fue observado cuando se adicionó 10 mM NaCl.
- Durante las experiencias en las que se adicionó GlcNAc y/o ManNAc al medio, en los cultivos conteniendo exclusivamente GlcNAc se observó que el consumo de glucosa y la producción de lactato se vieron asociados al crecimiento celular, en tanto la producción del ion amonio estuvo directamente relacionada con la concentración de GlcNAc presente en el medio de cultivo.
- No se observó, sin embargo, la misma relación entre la acumulación de amonio y el contenido de ManNAc.
- La presencia de 6 mM GlcNAc en el medio de cultivo indujo la desaparición de la isoforma de mayor contenido de ácido siálico, así como la disminución relativa de las otras glicofomas ácidas.
- Al adicionar ManNAc al cultivo se obtuvo un perfil de glicosilación de la rhEPO similar al del cultivo control, sin que se verificase un efecto positivo de este aminoazúcar sobre las isoformas producidas en presencia de GlcNAc.
- En las condiciones ensayadas, la adición de GlcNAc y/o ManNAc al medio de cultivo del clon B1A2 no indujo mejoras en el patrón de glicosilación de la rhEPO con respecto al control, por lo que no se continuó con su estudio en experiencias posteriores.
- La aplicación de una presión de 0,5 atm de CO₂ al medio MCE al 0,2% (V/V) SFB durante su almacenamiento permite mantener el pH en un valor oscilante entre 6,5 y 7,0, en forma independiente de la temperatura a la que el medio fue conservado.
- Aquellas muestras a las que no se aplicó CO₂ mostraron un incremento del pH directamente relacionado a la temperatura de almacenamiento.
- Cuando se realizó el control de pH mediante la aplicación de CO₂ se obtuvieron niveles menores de amonio en todas las condiciones ensayadas, comparándolas con los casos

en lo que no se controló esta variable.

- La manipulación cuidadosa durante el almacenamiento del medio de cultivo y la refrigeración de éste durante la alimentación del biorreactor en un proceso de cultivo continuo son necesarios para evitar la acumulación de amonio antes de su utilización.
- En los medios de cultivo mantenidos a 37°C, así como en el medio mantenido a temperatura ambiente sin agregado de CO₂ se superó el valor de 1 mM NH₄⁺.
- Los cultivos adicionados con 1,5 y 2,5 mM NH₄Cl presentaron un desarrollo similar al cultivo control; no ocurrió lo mismo con el cultivo con 4 mM, el cual no consiguió desarrollarse en estas condiciones.
- En presencia de muy bajas cantidades de amonio se observó la disminución en la proporción de glicoformas de mayor contenido de ácido siálico, aún cuando no se verificaron alteraciones en el desarrollo del cultivo con respecto al control. Esto indica que el proceso de glicosilación de la rhEPO producida por el clon B1A2 es altamente sensible a la acumulación de este ion.
- En la medida en que se incrementó la osmolalidad del medio de cultivo utilizado – aún tratándose de incrementos de poca magnitud, como por ejemplo la adición de 10 mM NaCl – se observó una disminución importante en la proporción relativa de las isoformas de rhEPO más glicosiladas, a pesar de no verificarse variaciones en los parámetros de crecimiento característicos del cultivo.
- La variación en la osmolalidad del sobrenadante de cultivo debida al metabolismo celular fue mínima (entre 0,03% y 0,06% respecto del valor inicial). Sin embargo, esta variación fue suficiente en algunos casos para afectar el grado de glicosilación de la molécula durante el transcurso del tiempo de cultivo.
- El proceso de glicosilación de la molécula de rhEPO es un proceso mucho más sensible a las variaciones en la osmolalidad del entorno celular que el crecimiento.
- En forma análoga, el efecto negativo sobre el crecimiento y la glicosilación de la molécula de rhEPO evidenciado al agregar NH₄Cl se debió en forma específica a la acción del ion, y no a un aumento en la osmolalidad del medio de cultivo.
- En términos de los parámetros metabólicos específicos se observó un comportamiento similar entre los cultivos en medio SMIF 6 adicionado con NaCl y aquellos cultivos en medio Zell-C1 de osmolalidad aproximadamente igual (hiperosmolales).
- Los valores de μ , q_{glc} y q_{gln} obtenidos en el cultivo adicionado de 180 mM NaCl fueron inferiores a los observados en el resto de los casos, confirmando que una osmolalidad

alta afecta directamente el crecimiento celular. A igual disponibilidad de nutrientes, los cultivos desarrollados en medios hiperosmolales presentaron un menor aprovechamiento de las fuentes de energía disponibles, lo que se tradujo en una menor producción de masa celular.

- Los parámetros μ , q_{glc} y q_{lac} siguieron una distribución gaussiana, en tanto q_{gln} , q_{glu} y q_{am} se ajustaron a un modelo lineal, en función de la osmolalidad del medio de cultivo, obteniéndose las ecuaciones características en cada caso. No fue posible ajustar un modelo satisfactorio para la q_{rhEPO} .
- El máximo de la curva ajustada para μ coincidió con el máximo de la curva ajustada para q_{glc} y el mínimo de la curva correspondiente a q_{lac} , indicando que en el rango próximo a 285 mOsm kg^{-1} se produce el mejor aprovechamiento de la glucosa, destinándola principalmente a la síntesis de masa celular en lugar de lactato.
- El rendimiento de lactato generado a partir de glucosa también siguió una distribución en forma de campana con un mínimo en la franja de osmolalidad indicada más arriba, confirmando la mayor eficiencia en el metabolismo de la glucosa.
- El rendimiento de amonio proveniente de la glutamina, por el contrario, presentó un incremento lineal con respecto a la osmolalidad del medio de cultivo.
- La baja variabilidad del parámetro q_{rhEPO} entre los replicados y entre los distintos tratamientos confirmaría que la variación en la osmolalidad del medio de cultivo no ejerce un efecto sustancial sobre la velocidad específica de producción de rhEPO.
- Se estableció que la actividad biológica estimada de la rhEPO producida por el clon B1A2 en el medio Zell-C1 aumenta en forma lineal en la medida en que disminuye la osmolalidad del cultivo.
- El cultivo del clon B1A2 en medio Zell-C1 adicionado de 60 mM NaCl permitió obtener un conjunto de isoformas con una muy alta actividad biológica estimada, casi 20% mayor que la obtenida en el cultivo control.
- La concentración de células viables obtenida al utilizar los medios de menor osmolalidad en cultivos por lote fue inferior con respecto al control, a pesar de haber utilizado un inóculo alto.
- Al emplear una estrategia de recambio parcial del sobrenadante por medio fresco en suspensiones celulares de alta densidad, el cultivo suplementado con 60 mM de NaCl tuvo un comportamiento poco satisfactorio desde el punto de vista de la posibilidad de utilizarlo en la producción industrial de rhEPO. Por otro lado, los cultivos suplementados con 120 mM y 80 mM NaCl presentaron resultados positivos y similares entre sí.

-
- El empleo de galactosa y manosa como sustituyentes parciales o totales de la glucosa en medios de cultivo hipoosmolales (Zell-C2 y Zell C3) afectó el normal crecimiento celular.
 - Las células no fueron capaces de crecer cuando se utilizó galactosa como hexosa mayoritaria en la composición de ese medio.
 - Por otro lado, cuando se usó manosa se obtuvieron valores de μ similares a los de los cultivos con glucosa, aunque la densidad celular máxima alcanzada fue inferior.
 - El empleo de un medio de cultivo de baja osmolalidad exige la presencia de una fuente de carbono rápidamente metabolizable – la glucosa – para permitir la obtención de altas concentraciones celulares.
 - No se debe, sin embargo, descartar la posibilidad de emplear galactosa y/o manosa como fuentes de carbono alternativas sin antes establecer su efecto sobre el perfil de isoformas producidas, aunque la viabilidad de utilizarlas como aditivos en medios de cultivo de baja osmolalidad se ve comprometida a partir de estos resultados.

6-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

CAPÍTULO 3

6. 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

6.1. OBJETIVOS

Diseñar un medio de cultivo libre de proteínas que favorezca el crecimiento y la productividad del clon B1A2 en suspensión, y permita obtener una molécula de rhEPO de alta calidad glicosídica, durante un proceso de producción en modo *batch*.

6.2. INTRODUCCIÓN

Hasta la actualidad, se han utilizado numerosas técnicas para el desarrollo de nuevos medios de cultivo, tanto para células procariontas como eucariotas. Estas técnicas abarcan desde el método tradicional de modificar una variable a la vez (Furuhashi y Takagi, 1984; Panda y col., 1983; Pundle y Siva Raman, 1994) hasta técnicas matemáticas y estadísticas más complejas que involucran el diseño de experimentos (*Design of Experiments*, DOE). Algunos ejemplos de diseños experimentales comúnmente empleados en el desarrollo de medios de cultivo incluyen diseños factoriales parciales y completos, diseños tipo Plackett-Burman, la matriz de Hadamard y diseños compuestos centrales (Silveira y col., 1991; Thiel y col., 1989; Castro y col., 1992; White y col., 1990; Wu y col., 2007; Tully y col., 2006). Estos métodos generalmente son seguidos de técnicas denominadas de optimización, como por ejemplo la metodología de superficies de respuesta (*Response Surface Methodology*, RSM), redes neuronales artificiales (*Artificial Neural Networks*, ANN), lógica difusa (*Fuzzy Logic*) y algoritmos genéticos (Ahuja y col., 2004; Moreira y col., 2007; Teissier y col., 1997; Jin y col., 1996; Wilkinson y col., 1996; Furtado y col., 2005). Kennedy y Krouse (1999) han publicado una revisión exhaustiva de las estrategias utilizadas en la optimización de medios de cultivo. Desafortunadamente, no existe una técnica multipropósito que se aplique a todas las situaciones, y frecuentemente es necesario evaluar varias metodologías hasta encontrar aquella que permita obtener el mejor resultado en un caso particular.

6.2.1. Diseño de experimentos

El diseño de experimentos (DOE) es un conjunto de metodologías y técnicas

utilizadas para mejorar el conocimiento de un sistema o proceso. Al diseñar un experimento, se planea una serie de pruebas estructuradas en las que se llevan a cabo variaciones predefinidas en las variables de entrada de manera de observar los cambios en una variable dependiente, o respuesta, previamente seleccionada, e identificar las causas de estos cambios.

La importancia fundamental del DOE reside en que permite obtener la máxima cantidad de información minimizando los recursos (insumos, tiempo, dinero) requeridos, y por ello es ampliamente utilizado en la industria para la mejora de procesos. Supera al tradicional método de modificar una variable a la vez, ya que permite evaluar el efecto de las variables de entrada en estudio en forma tanto individual como en diferentes combinaciones de ellas, lo que permite establecer relaciones a un nivel tanto particular como global.

El DOE no sustituye, sin embargo, al conocimiento específico del investigador sobre el sistema o proceso en estudio, el cual es imprescindible para seleccionar el diseño más apropiado de acuerdo con sus objetivos, elegir las variables a estudiar, asignar significado a los resultados obtenidos, interpretar relaciones entre las variables, reconocer la diferencia entre la significación práctica y la estadística, y mejorar el diseño en caso de que sea necesario.

Coleman y Montgomery (1993) definieron las siguientes etapas para el diseño de experimentos:

- Identificación y caracterización del problema
- Selección de los factores a estudiar y sus niveles
- Selección de las variables de respuesta
- Determinación del diseño experimental
- Realización del experimento
- Análisis de los datos obtenidos
- Redefinición del diseño experimental, en caso necesario
- Conclusiones

Con el fin de interpretar los resultados que se presentarán en este trabajo, resulta importante definir algunos términos específicos utilizados en el DOE y que serán empleados más adelante:

- **Factores o Tratamientos:** son las variables de entrada, que son variables independientes y que serán modificadas de acuerdo con el diseño experimental elegido.

- **Niveles:** son los valores de las variables de entrada que serán estudiados; indican el rango en el cual se desea evaluar el efecto de la variable independiente en estudio sobre la respuesta.
- **Diseño:** es un conjunto específico de experimentos en el que se definen las combinaciones de niveles de los factores para cada experimento, incluyendo el número de replicados de cada uno de ellos.
- **Variables dependientes o respuestas:** son los parámetros de salida (respuestas del sistema) seleccionados, resultantes de la acción de una o más variables de entrada, y que son medidas a través de los resultados experimentales obtenidos.
- **Interacción:** ocurre cuando el efecto de un factor depende del nivel de otros factores.

6.2.2. Metodología de superficies de respuesta

La metodología de superficies de respuesta o RSM es un conjunto de herramientas matemáticas y estadísticas utilizadas en el desarrollo, mejora y optimización de procesos (Myers y Montgomery, 1995). Esta metodología ha sido extensivamente aplicada a los procesos industriales (Brereton, 2003; Kennedy y Krouse, 1999; Dingstad y col., 2003), particularmente en situaciones en las que varias variables pueden influenciar una característica o propiedad del producto o proceso en estudio. Esta característica, cuali o cuantitativa, es llamada la *respuesta* del sistema.

A partir de resultados experimentales se trata de establecer la relación entre la respuesta en análisis y las variables que se cree afectan esta respuesta. Esta relación, expresada como una función, define una superficie. Suponiendo el caso más sencillo, una respuesta y depende de dos variables o factores independientes x_1 y x_2 , es decir, $y = f(x_1, x_2)$. Si la respuesta y sigue un modelo de primer orden con respecto a las variables x_1 y x_2 , y si no existe interacción entre estas variables, entonces la respuesta y es una superficie plana.

En el caso en que exista interacción entre los factores x_1 y x_2 , el modelo ajustado incluirá un término con el producto entre ellos (llamado *término de interacción*). Esta interacción puede tener un efecto positivo (*sinergismo*) o negativo (*antagonismo*) sobre la respuesta, y este efecto estará dado por el signo positivo o negativo del término de interacción, verificándose como una curvatura de la superficie generada.

La proyección sobre un plano de una superficie de respuesta origina un gráfico de contorno (denominado en la bibliografía como *contour plot*), en el cual las líneas unen

puntos en los que la respuesta tiene el mismo valor. Estos gráficos son muy utilizados cuando el número de factores es mayor que 2, por lo que la superficie se construye en una dimensión superior a la tercera y no es posible representarla en el espacio en un eje de coordenadas cartesianas.

6.2.3. *Diseño experimental de mezclas*

Si bien se encuentran ejemplos del uso de la RSM en el área de bioprocesos (Lee y Gilmore, 2005; Adinarayana y col., 2003; Zhi y col., 2005; Moyo y col., 2003; Vaidya y col., 2003; Kristo y col., 2003), la información sobre su aplicación a procesos industriales que involucren el cultivo de células de mamífero recombinantes es muy escasa. Estos sistemas complejos suelen involucrar numerosas variables, algunas de ellas fuertemente relacionadas entre sí. En estos casos resulta útil aplicar una clase particular de diseño experimental, denominado *experimento de mezclas*, en el cual los factores estudiados son considerados componentes de una mezcla, y la respuesta analizada es una función de la proporción de cada ingrediente en la misma. La suma total de los componentes de la mezcla debe ser constante.

Este tipo de análisis ha sido anteriormente abordado desde distintas ópticas, como problemas de *mezclas y variables de proceso* (Cornell, 1990; Kowalski y col., 2000, 2002), y como problemas de *mezclas de mezclas* (o *mezclas dobles*, Dingstad y col., 2003, 2004; Piepel, 1999).

Considerando una mezcla de q componentes, en la que x_i representa la proporción del i -ésimo ingrediente de la mezcla, deben cumplirse las siguientes condiciones:

$$x_i \geq 0 \quad , \quad i = 1, 2, \dots, q \quad (32)$$

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad (33)$$

Las restricciones impuestas en las Ec. (32) y (33) se muestran gráficamente en la Fig. 43 para $q = 3$. Puede observarse que el espacio sobre el que se estudiarán las mezclas de los q componentes es un triángulo. En general, la región experimental para un problema de q componentes constituye un *simplex*, es decir, una figura de lados regulares con q vértices en $(q-1)$ dimensiones.

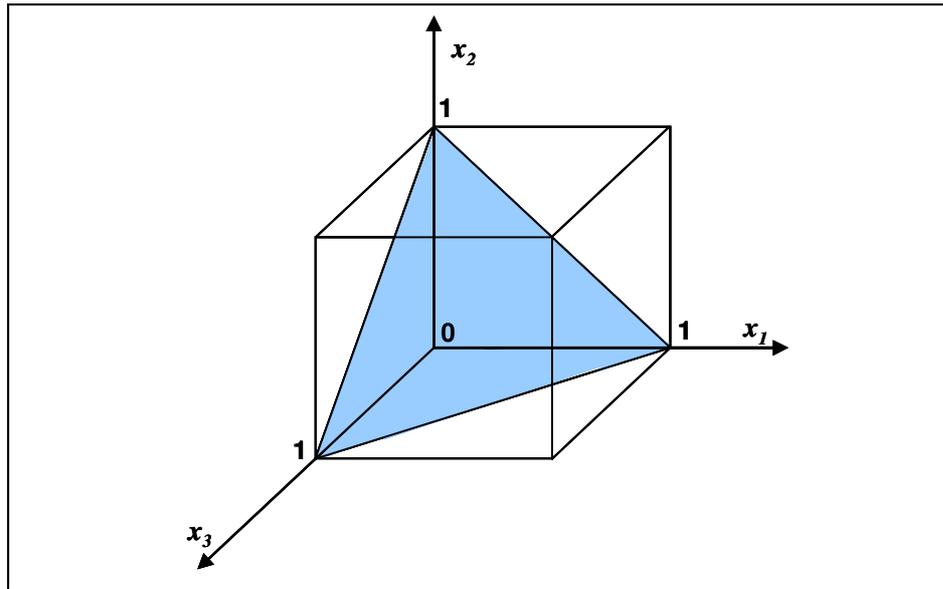


Fig. 43: Representación gráfica de las restricciones impuestas en un problema de mezclas ($q=3$).

El sistema de coordenadas que se emplea para determinar las proporciones de cada componente en la mezcla se denomina *sistema de coordenadas simplex*, y para el caso de $q = 3$ es el que se muestra en la Fig. 44. En este sistema de coordenadas, definimos como eje del componente x_i la línea que se extiende en forma perpendicular desde el vértice en que se representa la mezcla pura de este componente hasta el lado del triángulo opuesto a este vértice. La proporción del componente x_i en la mezcla varía desde 1 en el vértice (mezcla pura) y 0 en el punto opuesto (intersección entre el eje y el lado del triángulo). Cada uno de los vértices del triángulo equilátero corresponde a una mezcla pura (100% de uno de los componentes) y cada uno de sus lados representa las mezclas binarias (de dos factores) en las que no está incluido el componente situado en el vértice opuesto. Los puntos interiores indican mezclas ternarias, y en particular el punto central o *centroide* corresponde a la mezcla en la que $x_1 = \frac{1}{3}$, $x_2 = \frac{1}{3}$ y $x_3 = \frac{1}{3}$.

Un diseño *simplex lattice* es un conjunto de puntos uniformemente distribuidos dentro de un *simplex*. Para una dada mezcla de q componentes, la cantidad de puntos interiores al *simplex* está dada por el parámetro m . En un diseño *simplex lattice* $\{q, m\}$, las proporciones x_i que asumirá cada componente serán los $m + 1$ valores entre 0 y 1:

$$x_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, 1 \quad i = 1, 2, \dots, q \quad (34)$$

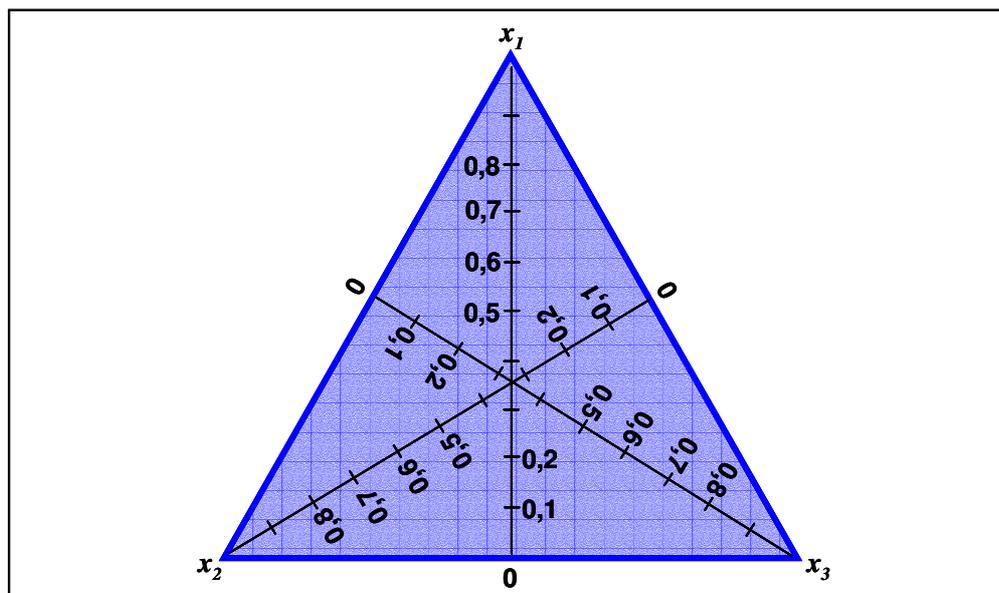


Fig. 44: Sistema de coordenadas *simplex* para $q=3$.

Para un diseño *simplex lattice* $\{3, 2\}$ tenemos entonces que

$$x_i = 0, \frac{1}{2}, 1 \quad i = 1, 2, 3 \quad (35)$$

Consecuentemente, los puntos experimentales de este diseño consistirán en tres mezclas puras y tres mezclas binarias:

$$(x_1, x_2, x_3) = (1, 0, 0), (0, 1, 0), (0, 0, 1), \left(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0\right), \left(\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}\right), \left(0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}\right) \quad (36)$$

Continuando con el ejemplo de mezcla de 3 componentes, es posible incluir puntos interiores al diseño anterior, obteniéndose así un diseño *simplex lattice aumentado*, con *centroide*. Este diseño permite obtener información sobre el efecto de las mezclas de los 3 componentes, al incluir el punto central (en el cual la proporción de los 3 componentes es igual) y otros puntos axiales, distribuidos uniformemente.

A igual número de puntos, el diseño *simplex lattice* aumentado es superior al *simplex lattice* en términos de información sobre las respuestas obtenidas con mezclas ternarias, ya que puede detectar curvaturas de la superficie que ocurren en el interior del *simplex*.

Un caso especial del diseño *simplex lattice* es el llamado *simplex lattice con restricciones*, o *constrained simplex lattice*, en el cual se impone una determinada exigencia a uno o más componentes de la mezcla. Estas restricciones pueden ser, por ejemplo:

- El componente x_i debe estar presente en la mezcla en una proporción igual o inferior a un valor predeterminado.
- El componente x_i debe estar presente en la mezcla en una proporción igual o superior a un valor predeterminado.
- La suma de las proporciones de los componentes x_i y x_{i+1} en la mezcla debe ser igual a un valor predeterminado.

6.2.4. Modelos polinómicos utilizados para ajustar las superficies

Para el caso de mezclas, los polinomios utilizados cuando se ajusta una superficie a una determinada respuesta son los propuestos por Scheffé (1958, 1963), y reciben el nombre de *formas canónicas* del modelo de primer orden:

$$\text{Lineal: } y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i \quad (37)$$

$$\text{Cuadrático: } y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i<j}^q \beta_{ij} x_i x_j \quad (38)$$

$$\text{Cúbico especial: } y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i<j}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k}^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad (39)$$

Al igual que se mencionó anteriormente, los términos $(\beta_{ij} x_i x_j)$ y $(\beta_{ijk} x_i x_j x_k)$ indican interacción entre los factores.

6.2.5. Diseño experimental de mezclas cruzadas

Un caso más complejo es el de estudiar el efecto sobre una o más respuestas de dos conjuntos de factores, cada uno de los cuales constituye una mezcla por sí mismo. En estas situaciones se utiliza el diseño experimental llamado *diseño de mezclas cruzadas* (*crossed mixture designs*).

En este trabajo inicialmente se abordó el problema de mezclas cruzadas a través de un *análisis simple*:

Se parte de un conjunto de factores x_1, x_2, x_3 , los que constituyen la mezcla X, y un segundo conjunto de factores z_1, z_2 y z_3 , componentes de la mezcla Z.

En primer lugar se define una serie de puntos experimentales para cada una de las mezclas a evaluar; es decir, diferentes combinaciones de (x_1, x_2, x_3) y diferentes combinaciones de (z_1, z_2, z_3) , de acuerdo con los requerimientos del problema. De esta manera se genera una *simplex lattice* para cada uno de los conjuntos de factores X y Z.

Seguidamente se realizan las experiencias, en este caso los cultivos, para todas las posibles combinaciones entre los puntos definidos para cada mezcla de componentes: cada combinación predefinida de (x_1, x_2, x_3) se evalúa en cada punto (z_1, z_2, z_3) , obteniéndose las respuestas en cada caso.

Luego se ajusta un modelo para la respuesta y dependiente de los factores que componen una de las mezclas analizadas – por ejemplo la mezcla de compuestos X – para una dada combinación experimental de los otros componentes z_1, z_2 y z_3 , la que se mantiene fija. Se repite el procedimiento para todas las respuestas, siempre considerando esa combinación particular de z_1, z_2 y z_3 .

A continuación se elige otra combinación de los factores Z, y se vuelven a construir las superficies para cada respuesta en función de los factores X, y así sucesivamente hasta haber considerado todos los puntos (z_1, z_2, z_3) .

Se construye entonces la función *Deseabilidad Global D* (explicada más adelante en el texto) para cada respuesta, considerando las superficies obtenidas (dependientes de los componentes X) para cada mezcla de z_1, z_2 y z_3 evaluada. Finalmente, se comparan los valores de *D* obtenidos, seleccionándose aquéllos más altos.

Una forma de análisis más compleja resulta del *análisis integral* del problema de mezclas cruzadas:

En un diseño de mezclas cruzadas, cada respuesta y depende simultáneamente de ambas mezclas, por lo que puede ser expresada como:

$$y = f(x) \times g(z) + e \quad (40)$$

En la Ec. (40), $f(x)$ es un modelo polinómico que indica la dependencia de la

respuesta con respecto a la primera mezcla de compuestos X , $g(z)$ es un modelo polinómico que indica la dependencia de y con respecto a la segunda mezcla de compuestos Z , y e es una variable aleatoria con media igual a cero y varianza independiente de X y Z (Dingstad y col., 2003).

Cuando $f(x)$ y $g(z)$ son modelos cuadráticos, como se seleccionó para el análisis de los datos realizado en el presente trabajo, el producto $f(x) \times g(z)$ resulta:

$$y = \sum_i \sum_j \beta_{i,j} x_i z_j + \sum_i \sum_{j<l} \beta_{i,jl} x_i z_j z_l + \sum_{i<k} \sum_j \beta_{ik,j} x_i x_k z_j + \sum_{i<k} \sum_{j<l} \beta_{ik,jl} x_i x_k z_j z_l \quad (41)$$

donde $i, k = 1, \dots, I$ $i < k$ y $j, l = 1, \dots, J$ $j < l$

Los parámetros β de esta ecuación resultan del producto de los coeficientes de regresión para las variables X y Z , siendo que deben obtenerse 36 de estos parámetros.

A partir del producto de modelos se obtiene la expresión final para la respuesta en análisis, de acuerdo con la Ec. (40), con la cual se construye una superficie para cada respuesta que depende de los seis componentes $x_1, x_2, x_3, z_1, z_2, z_3$. Con cada una de estas respuestas se obtiene una *función deseabilidad parcial* d_i , las que son combinadas para obtener la *función deseabilidad global* D . A partir de esta última función es posible predecir la combinación óptima de los seis compuestos en estudio.

6.2.6. Función deseabilidad global

Una forma sencilla de definir la región del espacio experimental en la que se optimizan los resultados cuando se tiene un número pequeño de respuestas consiste en superponer los gráficos de contorno correspondientes a las superficies de las respuestas en análisis y encontrar la zona común en la que éstas alcanzan simultáneamente los valores deseados.

Para el caso en que las respuestas analizadas son numerosas y se requiere que cumplan exigencias diferentes, generalmente se utiliza una modificación del método propuesto por Derringer y Suich (1980), por el cual se construye una función *deseabilidad* que incluye las prioridades y exigencias – muchas veces establecidas a partir del conocimiento empírico – del investigador.

Considerando que se tienen m respuestas, una determinada respuesta i asumirá un valor medido \hat{y} para un cierto conjunto de valores de los factores $x_1, x_2, x_3, z_1, z_2, z_3$. Dados los valores A y B de forma que $A \leq B$, si se desea que la respuesta sea máxima, la función deseabilidad parcial d_i para esta respuesta estará definida de la siguiente manera:

$$d_i = \begin{cases} \left(\frac{\hat{y} - A}{B - A} \right)^{w_i} & , \quad A \leq \hat{y} \leq B \\ 1 & , \quad \hat{y} > B \\ 0 & , \quad \hat{y} < A \end{cases} \quad (42)$$

En la ecuación anterior, w_i es el peso asignado a la respuesta i . Cuando $w_i=1$, la función d_i variará entre 0 y 1 en forma lineal en la medida en que se aproxime al valor deseado. En cambio, si se asigna un valor $w_i \neq 1$, d_i variará de una manera no lineal, adquiriendo valores cercanos a 1 sólo en la proximidad del valor deseado.

En forma análoga, cuando se desea que la respuesta i sea mínima puede describirse la función d_i como:

$$d_i = \begin{cases} \left(\frac{\hat{y} - B}{A - B} \right)^{w_i} & , \quad A \leq \hat{y} \leq B \\ 0 & , \quad \hat{y} > B \\ 1 & , \quad \hat{y} < A \end{cases} \quad (43)$$

En tanto cuando esta respuesta debe encontrarse dentro de un rango de valores deseables, la expresión de esta función se define como:

$$d_i = \begin{cases} 0 & , \quad \hat{y} < A \quad , \quad \hat{y} > B \\ 1 & , \quad A \leq \hat{y} \leq B \end{cases} \quad (44)$$

Una vez definida la función d_i para cada respuesta, se construye con ellas una

nueva función, denominada función *Deseabilidad Global* [función D , Ec. (45)], la cual es la media geométrica de las d_i .

$$D = \left(\prod_{i=1}^m d_i^{r_i} \right)^{1/\sum r_i} \quad (45)$$

El valor r_i se denomina *factor importancia asociado a la respuesta i* , y varía entre 1 (menos importante) y 5 (más importante). Se utiliza para asignar importancias relativas a las respuestas, afectando el valor final de D . Por su parte, D varía entre 0 (ninguna respuesta está en los valores deseables) y 1 (todas las respuestas se encuentran dentro de valores deseables).

Para cada valor experimental \hat{y} de la respuesta i se obtiene un valor de d_i ; y combinando todos los valores de d_i (es decir, considerando las m respuestas en estudio) se obtiene un valor de D . Estos valores de D se ajustan mediante un modelo y esto genera una superficie en la que se predicen los valores de D para todos los puntos del diseño. Al encontrar el máximo de esta función, se obtiene la combinación óptima de los componentes de las mezclas, en términos de los objetivos perseguidos.

6.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Con el objetivo de estudiar el efecto individual y combinado de tres azúcares (glucosa, galactosa y manosa) y tres aminoácidos (glutamina, glutamato y asparagina), se realizó un diseño experimental de mezclas cruzadas que permitió evaluar 50 mezclas diferentes de estos seis compuestos.

Los cultivos con la composición definida por el diseño anterior se realizaron en cinco bloques sucesivos. Las respuestas seleccionadas (ICV, q_{lac} , q_{am} , q_{rhEPO} y AB_t) se modelaron mediante la metodología de superficies de respuesta, realizando tanto un *análisis simple* como un *análisis integral* de las mismas.

Se definió una *función deseabilidad* para cada respuesta, las que se utilizaron para construir la función *Deseabilidad Global*, de acuerdo con los objetivos perseguidos. Este procedimiento permitió definir tres medios de cultivo que maximizan el crecimiento, la productividad y la calidad glicosídica de la molécula de rhEPO producida por el con B1A2.

6.4. RESULTADOS

6.4.1. *Diseño experimental de mezclas cruzadas*

Con este fin se seleccionaron seis compuestos para ser adicionados a un medio de cultivo basal: glucosa, galactosa, manosa, glutamina, glutamato y asparagina. El uso de fuentes de carbono alternativas a la glucosa (galactosa, por ejemplo) contribuyen a disminuir el *pool* intracelular de UDP-GNAc debido a la baja velocidad de síntesis de glucosa a partir de ellas (Ryll y col., 1994) y a la menor disponibilidad de UTP para la síntesis de los azúcar-nucleótidos bajo condiciones de limitación de glucosa. Estos hechos sugerirían un posible efecto beneficioso de la sustitución de glucosa por otros azúcares sobre la glicosilación de la proteína recombinante producida. Estas hipótesis, apoyadas por los resultados de Koll y col. (2000), indujeron a seleccionar la galactosa y la manosa para ser utilizadas en las experiencias que se describen a seguir. En forma análoga se evaluaron los aminoácidos glutamato y asparagina como potenciales sustitutos de la glutamina, por su menor capacidad amoniogénica.

El medio basal utilizado fue idéntico al medio Zell-C1 en términos de sales inorgánicas (incluyendo NaCl), vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos. Sin embargo, este medio de cultivo no poseía en su composición mono-, di-, tri- o polisacáridos, ni ninguno de los tres aminoácidos en estudio. Al adicionarse estos compuestos en las proporciones indicadas más abajo se obtuvo un medio de cultivo isoosmolal (aproximadamente 300 mOsm kg⁻¹).

Habiéndose comprobado ya el efecto que la osmolalidad ejerce sobre el metabolismo y el perfil de glicosilación de la rhEPO, se trabajó con un diseño experimental de mezclas cruzadas con el fin de independizar los resultados obtenidos de esta variable:

La primera mezcla estuvo constituida por las *hexosas* (glucosa, galactosa y manosa). Las combinaciones estudiadas fueron aquéllas definidas por el diseño *simplex lattice* {3,2} aumentado llamado *diseño S1* que se presentó en la Fig. 41.

La segunda mezcla en tanto estaba formada por los denominados *compuestos energéticos* (o fuentes de N): glutamina, glutamato y asparagina. Las combinaciones estudiadas son las indicadas en el *diseño S2*, el cual es un diseño *simplex* {3,2} con restricciones y aumentado con el punto central (*constrained* {3,2} *simplex-centroid design*, Fig. 45). La concentración total de estos aminoácidos fue igual a 5,1 mM, el cual es el resultado de la suma de las concentraciones de estos tres compuestos en el medio de cultivo SMIF 6, cuya composición es considerada como control. Por la misma razón, la restricción impuesta al diseño fue que la concentración de glutamina debía ser ≤ 4 mM, concentración en la que este aminoácido se encuentra en el medio SMIF 6.

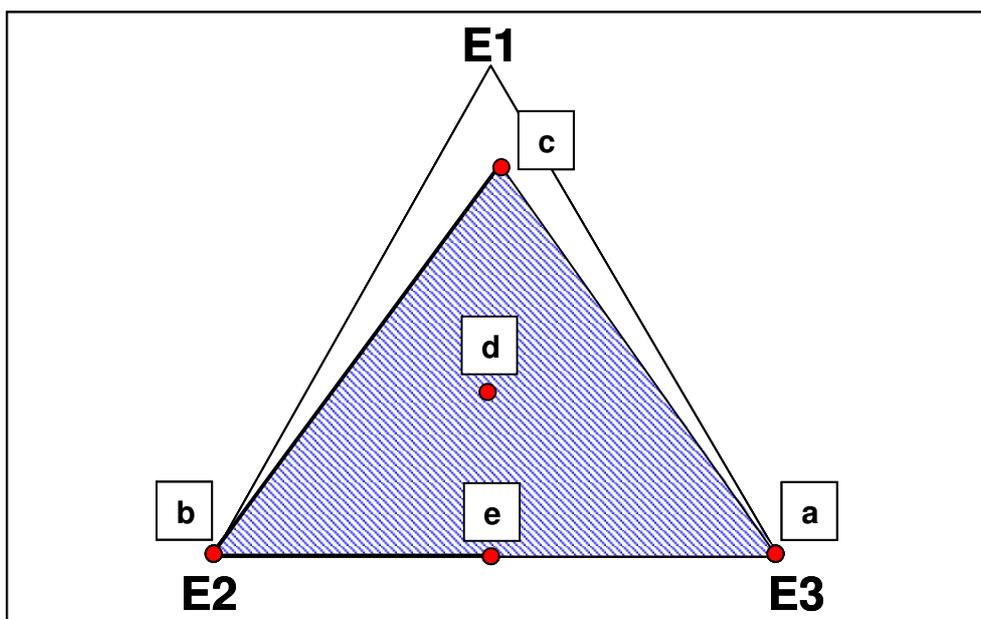


Fig. 45: Diseño S2: diseño experimental: diseño *simplex lattice* {3,2} con restricciones y aumentado con el punto central.

Cada punto del diseño S2 (es decir, el medio de cultivo basal adicionado con las diferentes combinaciones de compuestos energéticos) fue considerado un medio de cultivo diferente (Tabla L). En particular, en el medio Zell-C6 se encuentran los tres aminoácidos evaluados en las concentraciones presentes en el medio SMIF 6.

Tabla L: Composición de los medios de cultivos definidos por el diseño S2.

Punto experimental	Denominación del medio de cultivo	Glutamina (mM)	Glutamato (mM)	Asparagina (mM)
S2-a	Zell-C4	0,00	0,00	5,10
S2-b	Zell-C5	0,00	5,10	0,00
S2-c	Zell-C6	4,00	0,40	0,70
S2-d	Zell-C7	1,70	1,70	1,70
S2-e	Zell-C8	0,00	2,55	2,55

Las combinaciones de hexosas indicadas por el diseño S1 fueron evaluadas entonces en cada uno de estos medios de cultivo definidos por el diseño S2 dando un total de 65 combinaciones de las seis variables en estudio, como se muestra en la Fig. 46.

Los cultivos de células utilizados en los experimentos S2-a, S2-b, S2-c, S2-d y S2-e se iniciaron a partir de una suspensión del clon B1A2 amplificada en medio SMIF 6, la cual se encontraba al inicio de las experiencias en la fase de crecimiento exponencial.

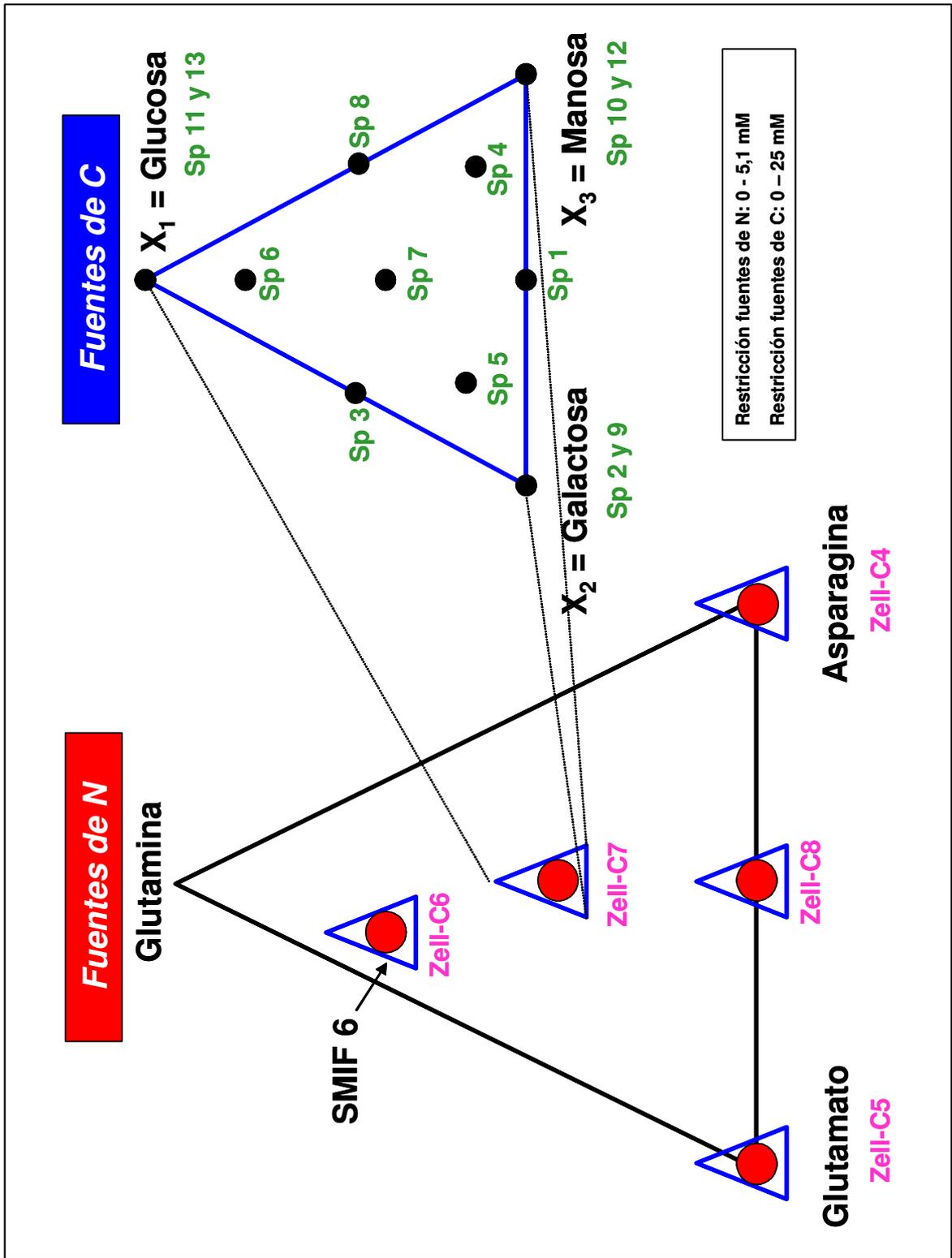


Fig. 46: Diseño experimental de mezclas cruzadas.

Esta suspensión celular se alicuotó y centrifugó durante 8 min a 200 *g*. El *pellet* celular fue resuspendido en cada uno de los medios de cultivo en análisis (50 ml por frasco *spinner*), con una concentración inicial de $2,0 \times 10^5$ cél. viables ml^{-1} . Se tomaron muestras cada 24 h, las cuales fueron utilizadas en la determinación de la concentración celular y de metabolitos. Parte del sobrenadante cosechado fue purificado y concentrado por ultracentrifugación, con el fin de evaluar las glicofomas de rhEPO producidas en cada caso.

Los datos experimentales resultantes en cada uno de los cinco experimentos se utilizaron para construir las curvas metabólicas del clon B1A2 en las condiciones ensayadas. El gráfico de ICV se presenta en la Fig. 47. Los valores de velocidad específica asociados a estas experiencias se obtuvieron a partir de las curvas de crecimiento celular (Fig. 48), consumo de glucosa (Fig. 49), producción de lactato (Fig. 50), consumo de glutamina (Fig. 51), producción de glutamato (Fig. 52), producción de amonio (Fig. 53) y producción de rhEPO (Fig. 54).

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

- Puede considerarse que algún factor indeterminado perjudicó el crecimiento del cultivo S1-m en el medio Zell-C4, ya que su duplicado (S1-k) se desarrolló normalmente, indicando que para las condiciones ensayadas (glucosa como única fuente de carbono en el medio) el clon B1A2 fue capaz de crecer satisfactoriamente. Se verificaron coincidencias entre los valores de los parámetros estudiados en ambos cultivos (ver más adelante), a pesar de la diferencia observada en su crecimiento. Éste es un ejemplo de la necesidad de realizar replicados de algunas de las corridas experimentales, para poder determinar la magnitud del error experimental, y evitar el riesgo de extraer conclusiones que no reflejan la realidad.
- Durante la experiencia en medio Zell-C6, el cultivo S1-i se contaminó, en tanto el replicado de este cultivo (S1-b) mantuvo su viabilidad hasta las 96 h de cultivo, solamente, sin que por ello se presentaran signos de contaminación.
- Los resultados obtenidos en las experiencias en los medios de cultivo Zell-C4, Zell-C5 y Zell-C6 mostraron que las células no son capaces de crecer en un medio de cultivo en el cual está presente exclusivamente la galactosa como fuente de carbono, razón por la cual en las siguientes experiencias (estudio de los medios Zell-C7 y Zell-C8) se eliminó el cultivo S1-i, analizándose el comportamiento celular en este medio de cultivo por uniplicado (cultivo S1-b).

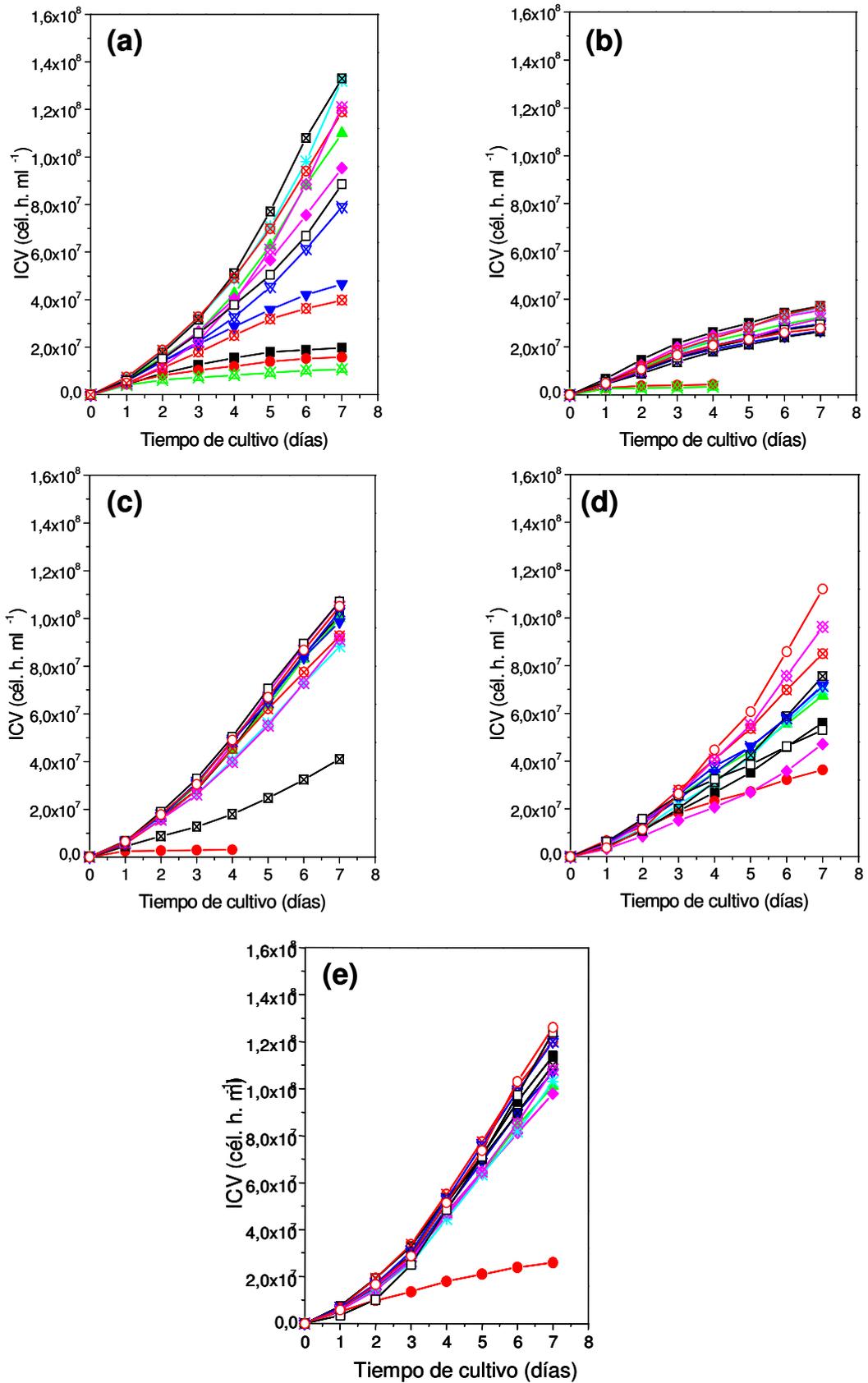


Fig. 47: Curvas de ICV en función del tiempo de cultivo para los cultivos del clon B1A2 en los medios (a) Zell-C4, (b) Zell-C5, (c) Zell-C6, (d) Zell-C7 y (e) Zell-C8: (■) S1-a; (●) S1-b; (▲) S1-c; (▼) S1-d; (◆) S1-e; (✕) S1-f; (⊠) S1-g; (⊗) S1-h; (△) S1-i; (▽) S1-j; (◇) S1-k; (□) S1-l y (○) S1-m.

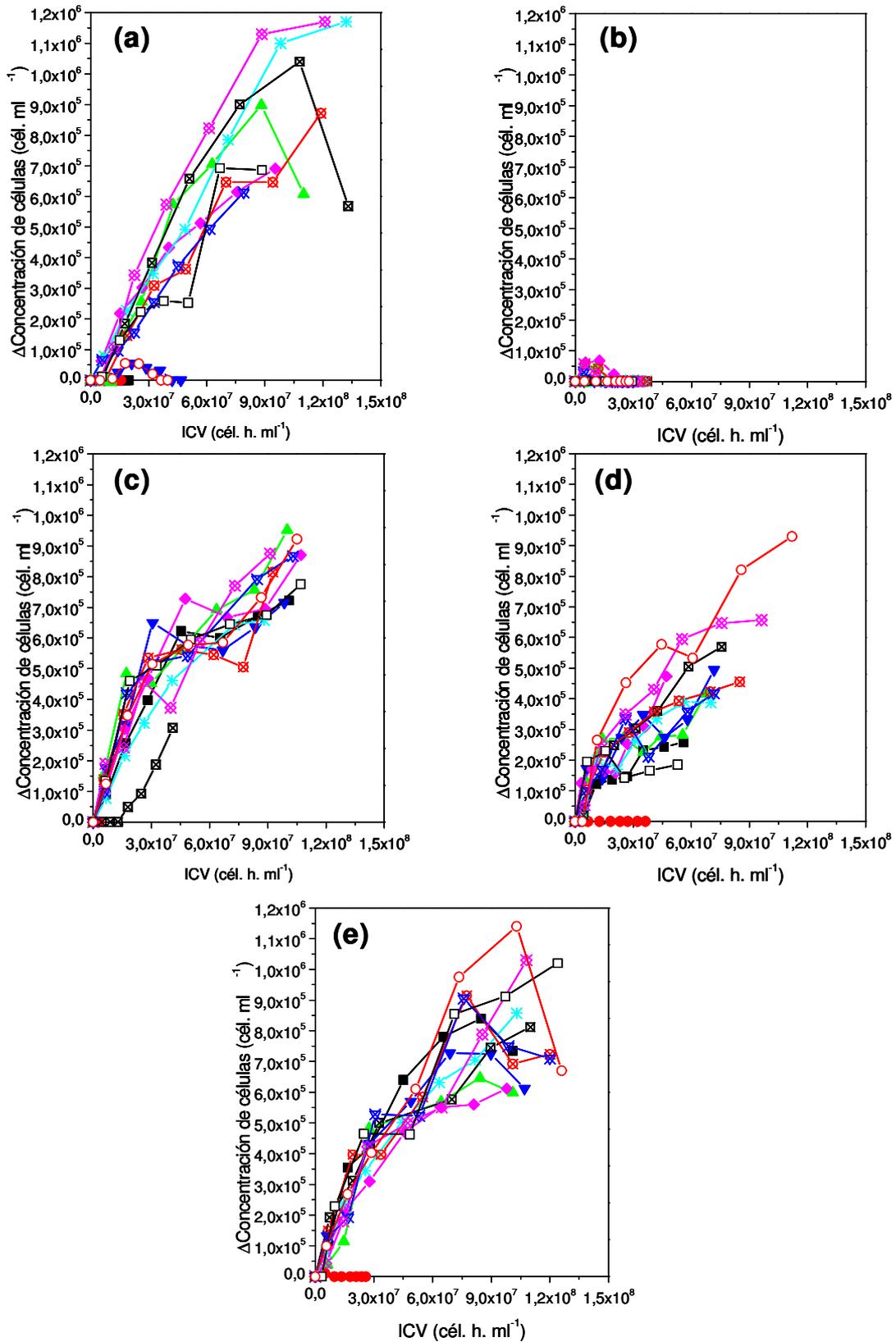


Fig. 48: Curvas de crecimiento celular en función de la ICV para los cultivos del clon B1A2 en los medios (a) Zell-C4, (b) Zell-C5, (c) Zell-C6, (d) Zell-C7 y (e) Zell-C8: (■) S1-a; (●) S1-b; (▲) S1-c; (▼) S1-d; (◆) S1-e; (✕) S1-f; (⊠) S1-g; (⊙) S1-h; (▲) S1-i; (▼) S1-j; (◆) S1-k; (□) S1-l y (○) S1-m.

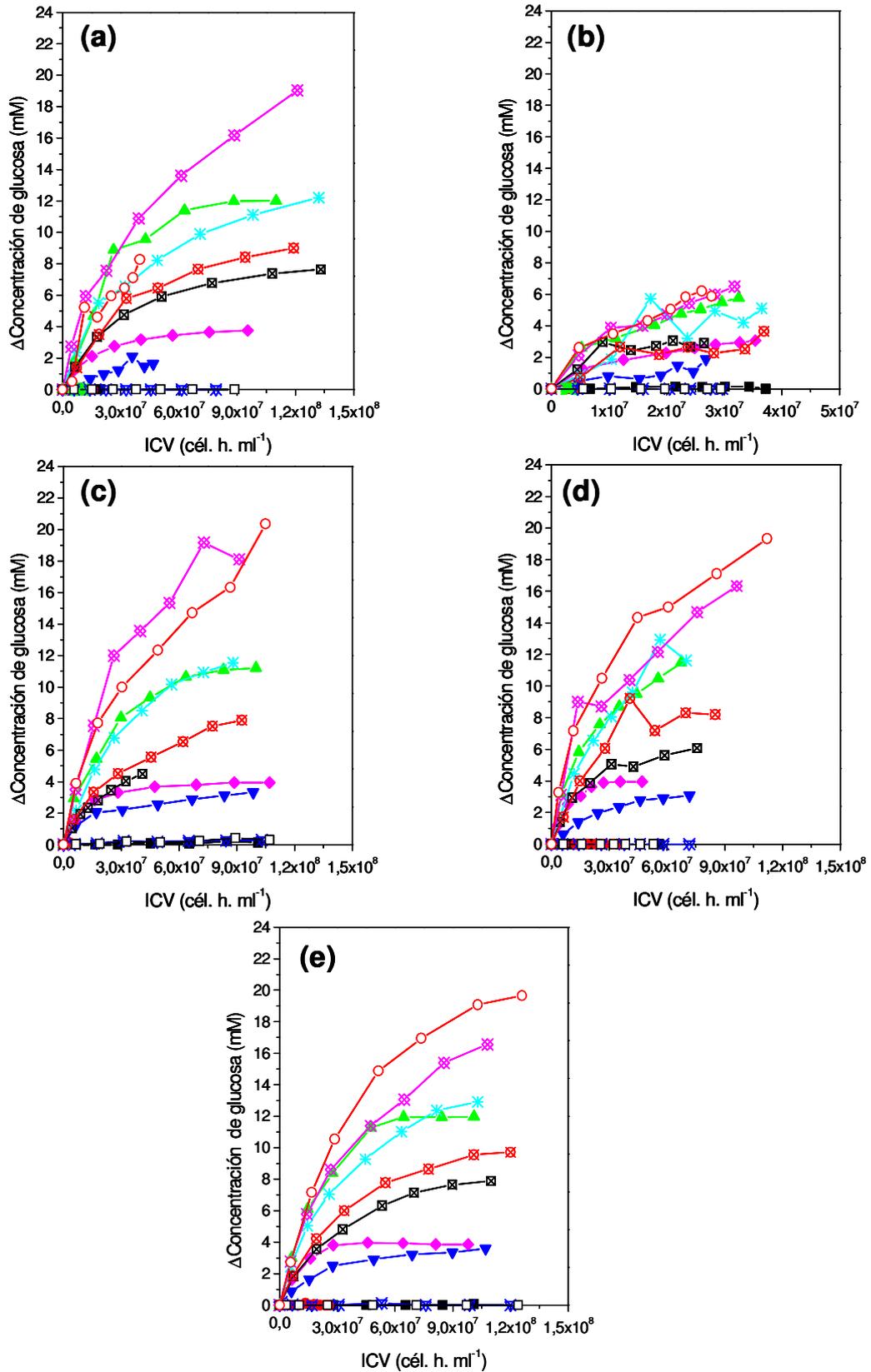


Fig. 49: Curvas de variación en la concentración de glucosa en función de la ICV para los cultivos del clon B1A2 en los medios (a) Zell-C4, (b) Zell-C5, (c) Zell-C6, (d) Zell-C7 y (e) Zell-C8: (■) S1-a; (●) S1-b; (▲) S1-c; (▼) S1-d; (◆) S1-e; (✱) S1-f; (⊠) S1-g; (⊗) S1-h; (△) S1-i; (▽) S1-j; (◇) S1-k; (□) S1-l y (○) S1-m.

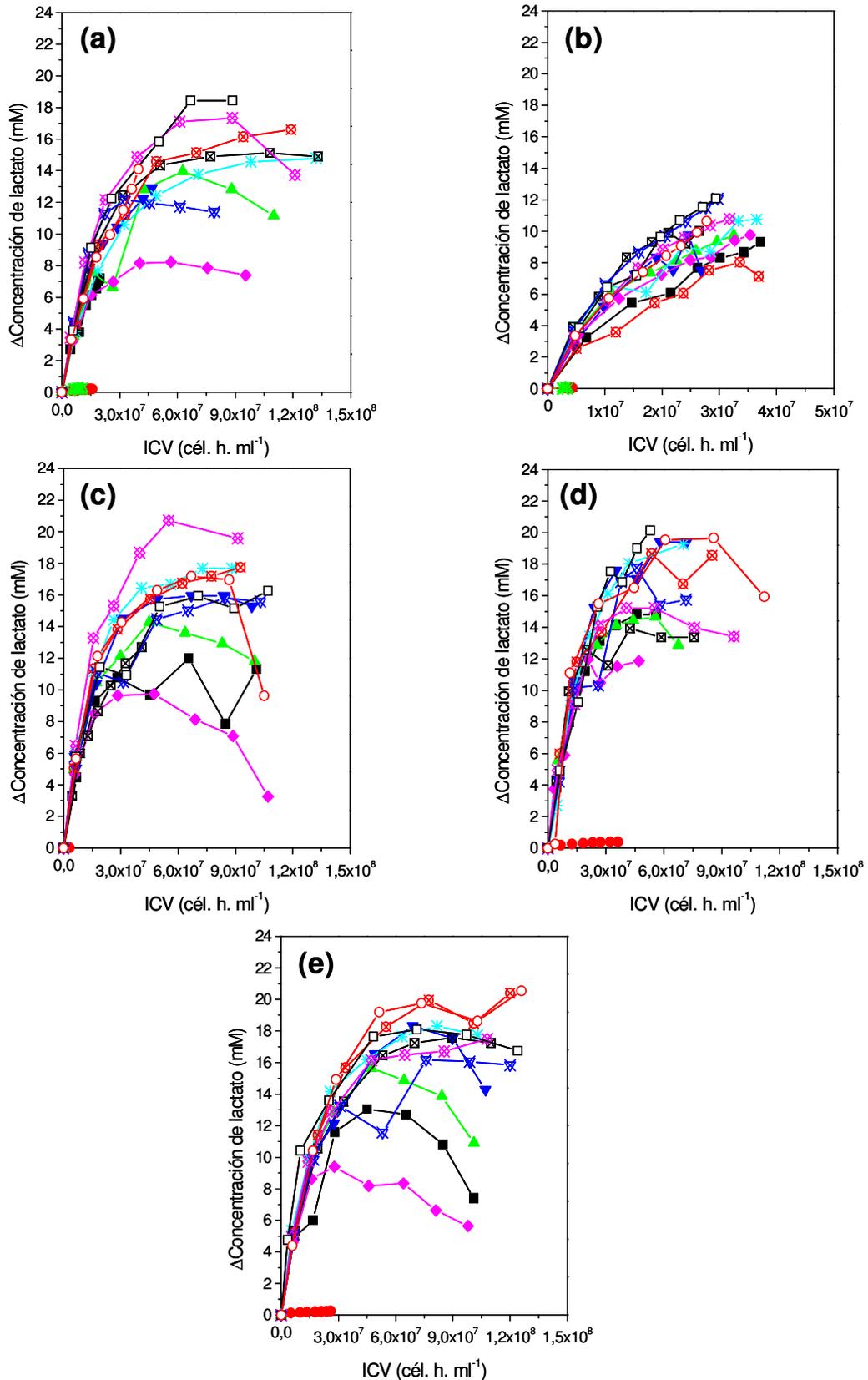


Fig. 50: Curvas de variación en la concentración de lactato en función de la ICV para los cultivos del clon B1A2 en los medios (a) Zell-C4, (b) Zell-C5, (c) Zell-C6, (d) Zell-C7 y (e) Zell-C8: (■) S1-a; (●) S1-b; (▲) S1-c; (▼) S1-d; (◆) S1-e; (✕) S1-f; (⊠) S1-g; (⊗) S1-h; (▲) S1-i; (▼) S1-j; (◆) S1-k; (□) S1-l y (○) S1-m.

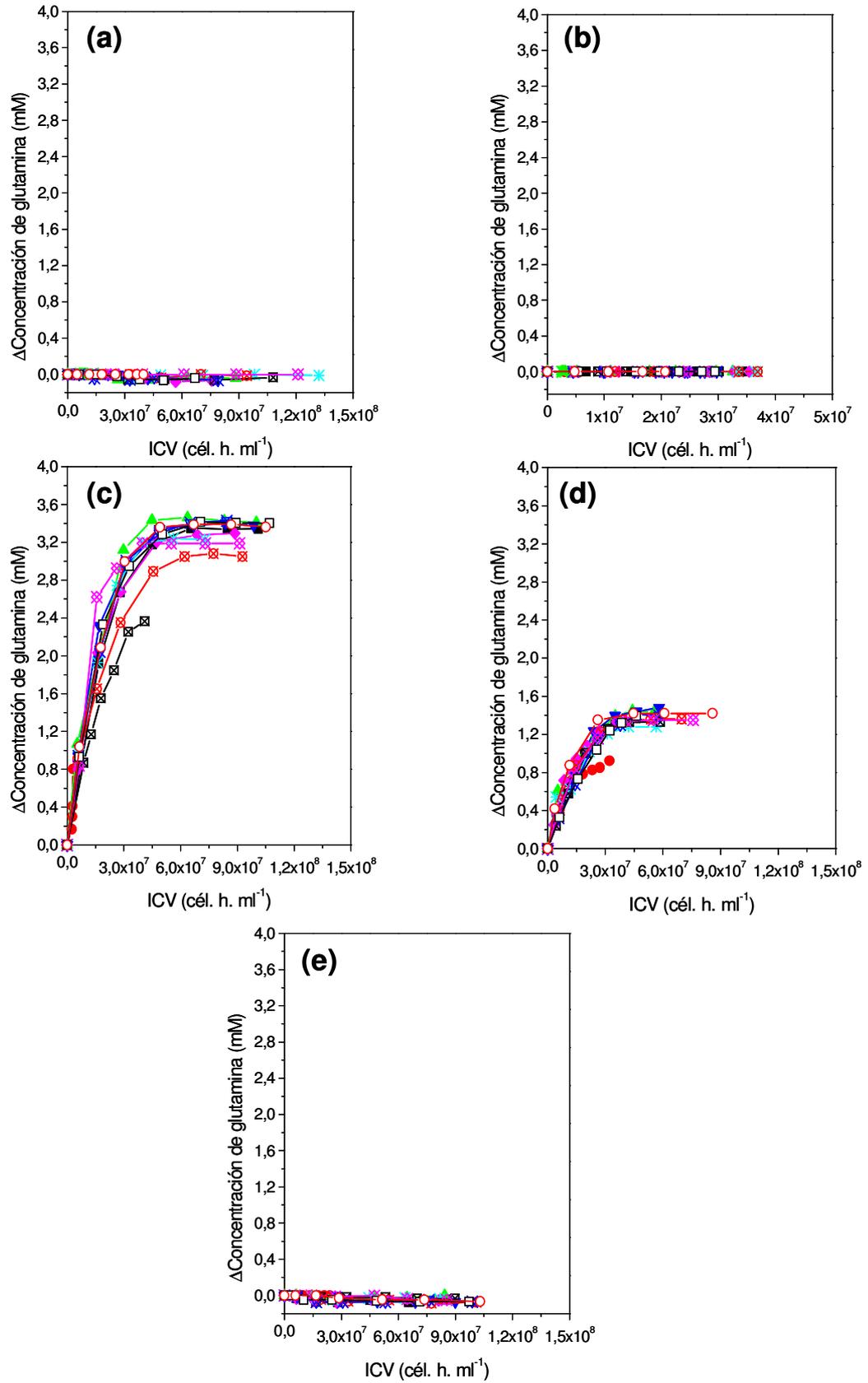


Fig. 51: Curvas de variación en la concentración de glutamina en función de la ICV para los cultivos del clon B1A2 en medios (a) Zell-C4, (b) Zell-C5, (c) Zell-C6, (d) Zell-C7 y (e) Zell-C8: (■) S1-a; (●) S1-b; (▲) S1-c; (▼) S1-d; (◆) S1-e; (✕) S1-f; (⊠) S1-g; (⊗) S1-h; (▲) S1-i; (▼) S1-j; (◆) S1-k; (□) S1-l y (○) S1-m.

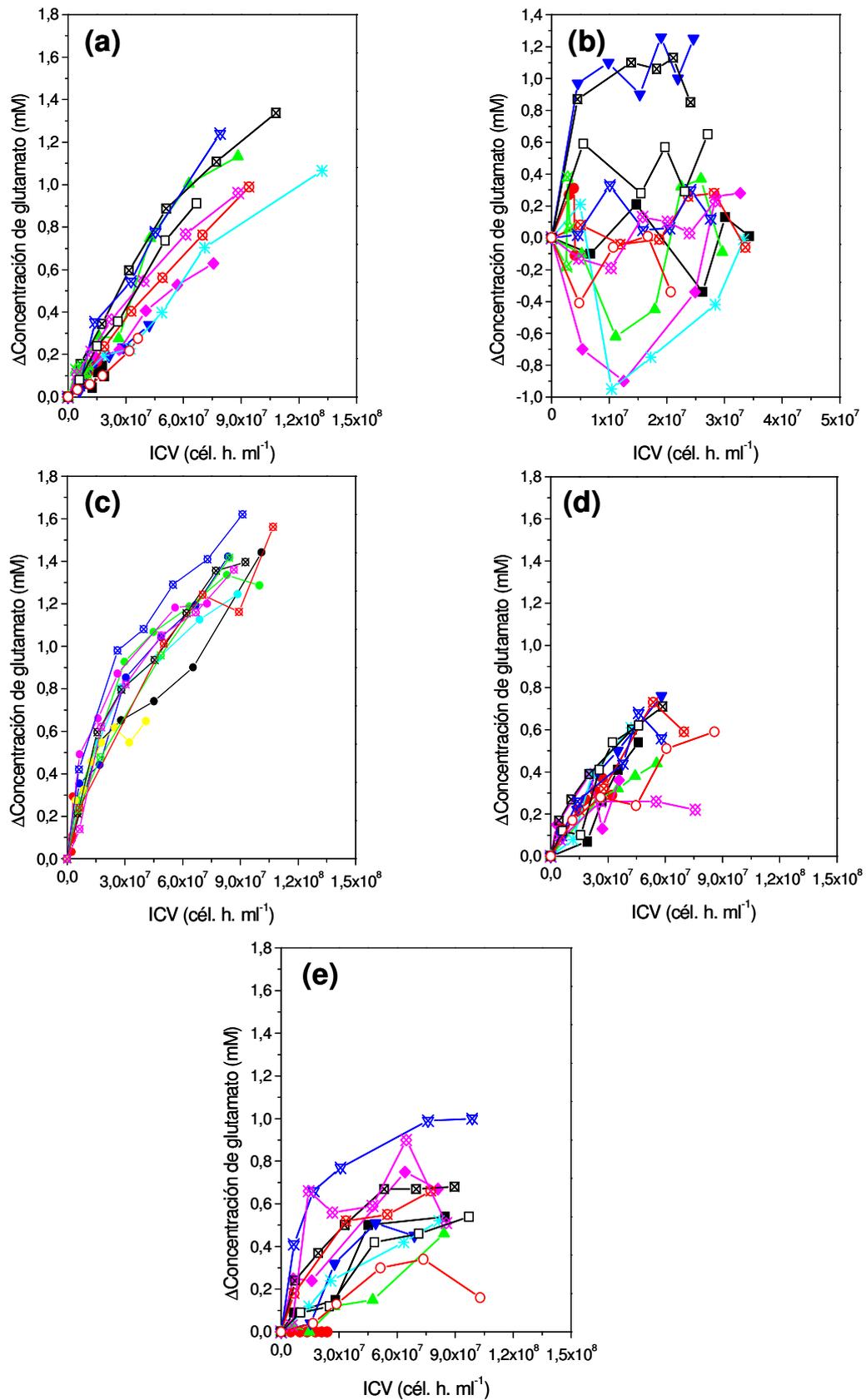


Fig. 52: Curvas de variación en la concentración de glutamato en función de la ICV para los cultivos del clon B1A2 en medios (a) Zell-C4, (b) Zell-C5, (c) Zell-C6, (d) Zell-C7 y (e) Zell-C8: (■) S1-a; (●) S1-b; (▲) S1-c; (▼) S1-d; (◆) S1-e; (✕) S1-f; (⊠) S1-g; (⊗) S1-h; (△) S1-i; (▽) S1-j; (◇) S1-k; (□) S1-l y (○) S1-m.

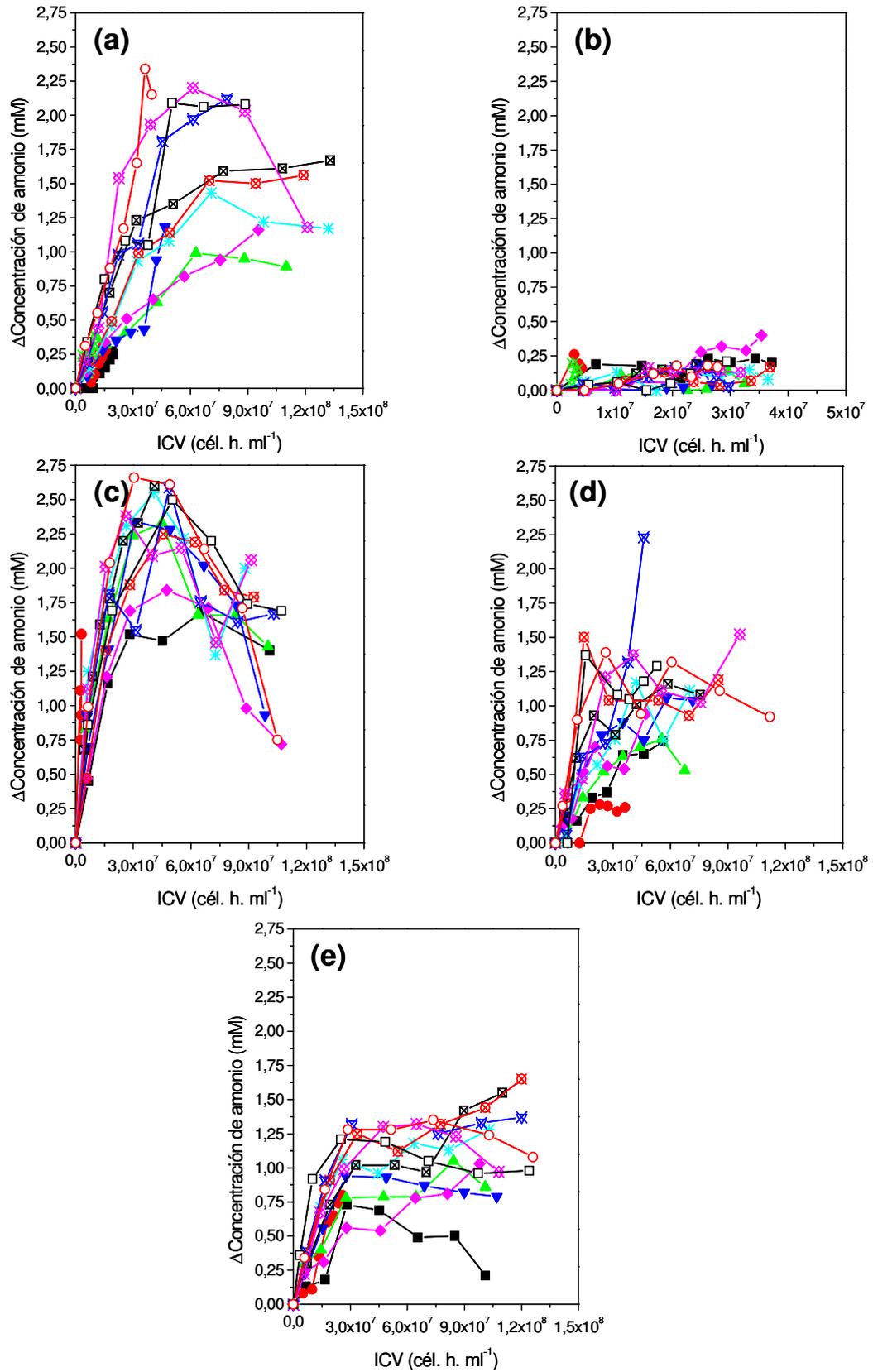


Fig. 53: Curvas de variación en la concentración de amonio en función de la ICV para los cultivos del clon B1A2 en los medios (a) Zell-C4, (b) Zell-C5, (c) Zell-C6, (d) Zell-C7 y (e) Zell-C8: (■) S1-a; (●) S1-b; (▲) S1-c; (▼) S1-d; (◆) S1-e; (✕) S1-f; (⊠) S1-g; (⊗) S1-h; (▲) S1-i; (▼) S1-j; (◆) S1-k; (□) S1-l y (○) S1-m.

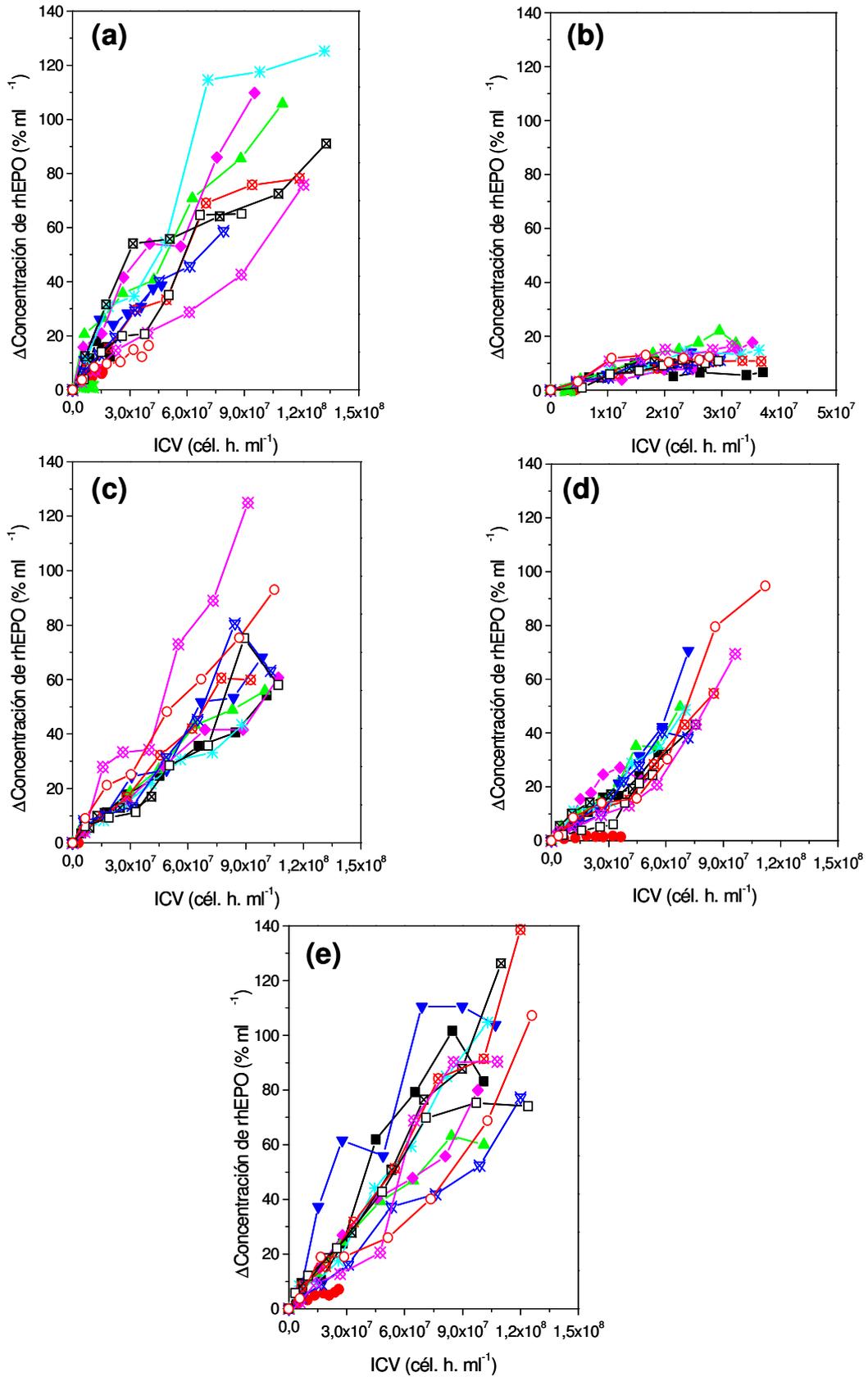


Fig. 54: Curvas de variación en la concentración de rhEPO en función de la ICV para los cultivos del clon B1A2 en los medios (a) Zell-C4, (b) Zell-C5, (c) Zell-C6, (d) Zell-C7 y (e) Zell-C8: (■) S1-a; (●) S1-b; (▲) S1-c; (▼) S1-d; (◆) S1-e; (✕) S1-f; (⊠) S1-g; (⊗) S1-h; (▲) S1-i; (▼) S1-j; (◇) S1-k; (□) S1-l y (○) S1-m.

6.4.2. Análisis de las curvas metabólicas

Un hecho importante que aparece en forma evidente es la ausencia de crecimiento en los cultivos con 100% de galactosa, S1-b y S1-i, observado en todos los medios de cultivo ensayados. Contrariamente a lo propuesto por otros autores para otros clones provenientes de la línea celular CHO (Altamirano y col., 2000, 2001a, 2004, 2006a), resulta claro que la galactosa no es una fuente de carbono eficiente para el clon B1A2, ya que éste solamente consigue, a lo sumo, sobrevivir – sin replicarse – cuando se utiliza exclusivamente esta hexosa, a pesar de encontrarse presentes otras especies potencialmente energéticas como la glutamina. En particular, en el medio con la mezcla pura de galactosa se verificó un consumo de glutamina cercano a 1 mM, tanto en Zell-C6 como en Zell-C7, a pesar de no verificarse crecimiento en este cultivo. La energía obtenida a partir de ella fue probablemente empleada en mantener la viabilidad del cultivo, sin que se verificara desarrollo celular. El factor limitante del crecimiento celular sería entonces la baja velocidad de metabolización (ingreso y fosforilación) de la galactosa.

El consumo de la fuente de nitrógeno en cultivos conteniendo exclusivamente galactosa ha sido previamente descrito por Altamirano y col. (2000): en cultivos en modo *batch* estos autores observaron un bajo consumo del azúcar (menos de una quinta parte de su concentración inicial, 20 mM), acompañado de un incremento en el consumo de la fuente de nitrógeno – glutamina o glutamato –, los cuales se encontraban en concentraciones más altas que las utilizadas en este trabajo (7 mM). A pesar del consumo de estos aminoácidos como proveedores de energía, la densidad celular máxima alcanzada en estos cultivos fue siempre inferior a la de los cultivos control (aproximadamente 8×10^5 cél. viab. ml⁻¹). Al disminuir la concentración de la fuente de nitrógeno, el crecimiento se detuvo y el cultivo entró en la fase de muerte. El mayor consumo de aminoácidos redundó como era esperable en valores de q_{am} significativamente más altos coincidentemente con lo observado en las experiencias realizadas en este trabajo de tesis. Los mismos autores establecieron en cultivos en modo *fed-batch* que al alimentar el cultivo con galactosa, luego de haber utilizado glucosa durante la fase de crecimiento, el valor de μ se hizo prácticamente igual a cero, probablemente por un arresto de las células en la fase G1 del ciclo celular, aunque el cultivo logró mantenerse viable en base al consumo de glutamato (Altamirano y col., 2001a).

Estas evidencias sugieren que, como se confirmó en los cultivos S1-b, la galactosa no es un azúcar que soporte el normal desarrollo de las células, aunque podría influenciar la glicosilación de la proteína sintetizada.

En general se observó gran dispersión en los valores finales de ICV versus el tiempo de cultivo en los medios con 100% de asparagina (Zell-C4) y con partes iguales de

los tres aminoácidos (Zell-C7), lo que indicaría una mayor dependencia del crecimiento con respecto a la composición de azúcares en estas condiciones.

La disparidad observada en el crecimiento celular en estos medios señaló la existencia de una cierta correlación entre el grado de desarrollo del cultivo y el contenido de glucosa: los valores de ICV más altos se obtuvieron en los cultivos con 100% de esta hexosa, seguidas de aquellos cultivos en donde la mezcla glucosa+manosa era mayoritaria frente al contenido de galactosa. Los cultivos sin glucosa presentaron un menor crecimiento, siendo el caso extremo el punto S1-b, como se indicó, en el que no se detectó aumento en la concentración de células viables. Se ha reportado que el consumo de galactosa en células CHO recombinantes se verifica exclusivamente a partir del agotamiento de la glucosa, cuando ésta está presente en el medio de cultivo, y que su consumo se observa en forma conjunta a la remetabolización del lactato (Altamirano y col., 2006a).

Si bien depende del clon particular, se ha publicado que las células CHO pueden crecer aproximadamente a la misma velocidad en manosa y glucosa (Kurano y col., 1990; Altamirano y col., 2000), lo que está de acuerdo con las observaciones realizadas en las experiencias en las que se utilizó estas fuentes de carbono.

Las densidades celulares más altas se obtuvieron en el medio Zell-C4 y el medio Zell-C8, ambos sin glutamina, para aquellas suspensiones con alto contenido de glucosa, seguida de las diferentes mezclas de glucosa y manosa.

En el medio Zell-C6 (con una mezcla aminoacídica igual a la del SMIF 6) se observó un desarrollo no tan alto, si bien más parejo entre todos los cultivos. La excepción a esta observación fue el cultivo S1-g, el cual contenía proporciones iguales de los tres azúcares. Esto último fue llamativo, ya que este cultivo había tenido un desarrollo comparable al resto de ellos en ocasiones anteriores: la composición mayoritaria de glucosa+manosa probablemente habría sido suficiente para observar un crecimiento satisfactorio en un medio con un contenido estándar de aminoácidos. Situaciones como éstas son consideradas en la determinación del error experimental, lo que hace posible obtener conclusiones válidas a pesar de la variabilidad observada.

Por otra parte, merece destacarse que los cultivos en medio Zell-C5 evolucionaron de manera muy similar, con un crecimiento celular prácticamente nulo en todos los casos. Sin embargo, la mayoría de las suspensiones consiguió mantener cierta cantidad de células viables por varios días, y de ahí la diferencia observada en las curvas de ICV versus el tiempo de cultivo.

En términos generales, el perfil de consumo de glucosa y, consecuentemente, los valores de q_{glc} mostraron fuerte correlación con el contenido de este azúcar en el medio de

cultivo en estudio. En la Fig. 49 se observa que el consumo de glucosa se produjo durante todo el cultivo; en ninguno de los casos se evidenció un agotamiento temprano de este azúcar, detectándose en baja concentración hasta el último día del cultivo. Por esta razón, y debido a las densidades celulares alcanzadas, es posible inferir que otras especies presentes también son consumidas durante el crecimiento celular.

Como se mencionó anteriormente, la mayor concentración de células viables se observó en aquellos cultivos con una mezcla pura de glucosa, indicando que ésta es la hexosa cuyo rendimiento en masa celular es más eficiente.

Contrariamente a lo observado para la glucosa, para cada una de las cinco experiencias las pendientes de las curvas de producción de lactato fueron similares en todos los cultivos, durante las primeras 48 h a 96 h de cultivo. Luego, esta velocidad varió en forma diferente para cada suspensión celular, lo que condujo a la acumulación de distintas cantidades de este metabolito en el sobrenadante al final de la experiencia. Debido a que en el cálculo de las velocidades específicas de consumo/producción se incluyó la mayor cantidad de puntos experimentales para los cuales se obtuvo un coeficiente $R \geq 0,95$, los valores de q_{lac} para estos cultivos (presentados más adelante) mostraron una variabilidad mayor a la esperada por el análisis visual de las curvas. La variación en los valores de q_{lac} al utilizar diferentes fuentes de carbono ya había sido informada en las publicaciones de Altamirano y col. (2001a).

Aquellos cultivos con mayor contenido de glucosa alcanzaron concentraciones más altas de lactato en comparación a los cultivos con manosa, indicando un efecto beneficioso del uso de esta última como sustituto de la glucosa en los cultivos de este clon. En aquellos cultivos con mezclas ternarias de hexosas se produjo lactato en niveles proporcionales a la concentración de glucosa+manosa, aún en aquellos cultivos que mostraron muy bajo crecimiento, como el S1-d y el S1-m en medio Zell-C4. Se observó, en tanto, una baja acumulación de este metabolito en los cultivos con mayoría de galactosa, probablemente debido al nulo crecimiento observado en estos cultivos. La drástica reducción en la producción de lactato en presencia de galactosa ya había sido reportada por otros autores (Altamirano y col., 2000).

La presencia de células viables en los cultivos en medio Zell-C5 se reflejó en el consumo de la glucosa presente en el medio de cultivo, así como en la generación de lactato hasta niveles relativamente normales (10 mM-12 mM en las primeras 48 h), un hecho que llama la atención en cultivos que no se desarrollaron. A diferencia de lo que ocurrió en otros medios de cultivo, en esta ocasión la concentración final de lactato alcanzada en los cultivos no mostró una variabilidad tan alta.

En los medios de cultivo Zell-C4 y Zell-C5 se observaron valores bajos de q_{glc} para los cultivos con 100% de este azúcar (S1-k y S1-m), aún cuando se verificó un crecimiento normal (como ocurrió en el medio Zell-C4). Los valores de q_{glc} obtenidos para los cultivos en presencia de glutamina fueron tres veces superiores, indicando que cuando este aminoácido está presente, el metabolismo celular se encuentra desregulado, haciéndose un uso ineficiente de la glucosa. La utilización de asparagina, consecuentemente, permite mejorar la eficiencia de la utilización que el clon B1A2 hace de esa hexosa.

Es interesante observar que en todos los cultivos de la experiencia en medio Zell-C4 se genera glutamato, cuando ni éste ni la glutamina formaban parte de la composición de este medio. La velocidad de producción de glutamato se mantuvo relativamente constante durante todo el tiempo de cultivo, obteniéndose valores superiores a 1 mM. El glutamato generado deriva del α -cetoglutarato originado por transaminación del aspartato, el cual a su vez proviene de la desaminación de la asparagina. Se ha postulado que los medios de cultivo para células de mamífero que no poseen glutamina en su composición deben ser suplementados con aspartato o asparagina, de manera de proveer los precursores intracelulares para la síntesis de glutamina (glutamato y amonio) y también debido a que la síntesis de esos dos aminoácidos puede verse reducida en medios libres de glutamina (Doverskog y col., 1997).

La velocidad de consumo de la asparagina, por otra parte, es entre 5 y 10 veces menor que la velocidad de consumo de la glutamina (Kurano y col., 1990) y del glutamato (Altamirano y col., 2004), cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono. Este hecho indica que el clon B1A2 realiza un aprovechamiento mucho más eficiente de la energía aportada por la asparagina, siendo capaz de desarrollarse normalmente en presencia de este aminoácido. La asparagina tiene así un doble efecto positivo sobre el metabolismo celular: por un lado se consume menos glucosa, y por otro se consume lentamente asparagina, obteniéndose sin embargo una alta masa celular.

La concentración de glutamato en los sobrenadantes de cultivo del medio Zell-C6 (con la composición aminoacídica del medio SMIF 6) fue creciendo en la medida en que avanzaba el tiempo de cultivo, en forma similar a lo observado en las experiencias en medio Zell-C4. Los valores acumulados de este aminoácido fueron los más altos, si se comparan todas las experiencias, coincidiendo con el mayor contenido de glutamina de este medio. Este hecho, sumado al mínimo consumo de glutamato que realiza el clon B1A2, resulta en una utilización muy ineficiente, desde el punto de vista energético, de la glutamina del medio de cultivo.

También se observó acumulación de glutamato en los cultivos en los medios

Zell-C7 y Zell-C8, si bien la cinética de producción fue diferente en ambos casos. En los cultivos en presencia de partes iguales de los tres aminoácidos se observó una acumulación de glutamato en forma constante y similar para todos los cultivos, aunque las concentraciones máximas alcanzadas fueron menores a las verificadas en las experiencias mencionados anteriormente. En los cultivos conteniendo glutamato y asparagina (Zell-C8) la producción del primero fue muy dispar, aunque también en este caso los valores finales no superaron el valor de 1 mM.

Se ha propuesto que las células CHO pueden consumir glutamato (Altamirano y col., 2000, 2001b, 2004), observación que no pudo ser replicada en este trabajo de tesis. Hasta ahora, siempre se verificó una producción de esta especie en forma relativamente constante durante todo el tiempo de cultivo. Sin embargo, cuando se utilizó el medio de cultivo Zell-C5, con 100% de glutamato como fuente de energía para alimentar al TCA, se observó por primera vez un comportamiento diferente, determinándose en ciertos cultivos un aparente consumo de este aminoácido (indicado en el gráfico como una variación negativa de la producción). Este hecho podría haberse inducido debido a la ausencia de otras fuentes de energía más eficientes, como son la glutamina y la asparagina (esto último verificado por el desarrollo alcanzado en los cultivos en medio Zell-C4). Estos resultados indican que el clon B1A2 no es capaz de utilizar eficientemente el glutamato, un hecho observado ya en otras líneas celulares y que se debe probablemente a una baja eficiencia del sistema de transporte de este aminoácido al interior de la célula (Butler y Christie, 1994).

La alta variabilidad de las mediciones realizadas en los sobrenadantes de los cultivos en medio Zell-C5 impidió obtener resultados concluyentes, a pesar de haberse repetido el análisis de las muestras. En ciertos casos se observó una leve acumulación de glutamato en el sobrenadante, mientras que en otros pareció verificarse un consumo del mismo, al menos durante el inicio del cultivo, para luego incrementarse su concentración, como si estuviese siendo generado. Finalmente, en otros cultivos la concentración de glutamato se mantuvo oscilante alrededor del cero, sin indicar consumo ni producción de este aminoácido. Por esta razón los resultados de q_{glu} aparecen como no determinados en la Tabla LII. A pesar de ello puede concluirse que cuando se emplea glutamato en el medio de cultivo en ausencia de glutamina y asparagina el crecimiento celular obtenido no es suficiente para considerar el uso de este medio a escala productiva.

Considerando separadamente las experiencias en medios de cultivo conteniendo glutamina (Zell-C6 y Zell-C7), las curvas obtenidas para el consumo de este aminoácido fueron prácticamente idénticas para todos los cultivos (con la excepción ya mencionada del cultivo S1-g del medio Zell-C6). En todos los casos se llegó prácticamente al agotamiento de la glutamina presente, entre las 48 h y 72 h de cultivo.

Pudo observarse que las concentraciones de amonio alcanzadas en el medio Zell-C6 fueron las más altas ($>1,5$ mM), considerando el conjunto de los cinco medios de cultivo evaluados. Estos valores fueron coherentes con resultados anteriores obtenidos en medios de cultivo con esta concentración de glutamina. La acumulación neta de amonio en los cultivos en medio Zell-C4, Zell-C5 y Zell-C8 es el resultado del balance entre su producción a partir de la asparagina, vía la asparaginasa, y/o el glutamato, vía la GDH, y su consumo para la síntesis de glutamina a partir de estos aminoácidos.

Por otro lado, los niveles de este ion acumulados en el sobrenadante al final de los cultivos en medio Zell-C4 (100% de asparagina) se condicen con el grado de desarrollo de éstos, encontrándose dentro de la franja de valores considerados normales; es decir, similares a los observados en los cultivos control de experiencias anteriores. El medio Zell-C8 (con glutamato y asparagina, pero sin glutamina), por otra parte, presentó valores inferiores de acumulación de amonio en el sobrenadante, lo que se condice con lo observado por Kurano y col. (1990). Estos autores adjudican este hecho a la menor velocidad de consumo de la asparagina (en presencia de glutamato) con respecto a la velocidad de consumo de la glutamina.

Se observó también en este medio de cultivo que las concentraciones máximas de amonio se correlacionaron con la concentración de glucosa presente en el mismo: a mayor contenido del azúcar, mayores fueron los niveles de amonio alcanzados, indicando la estrecha relación que existe entre la glicólisis y la glutaminólisis. A mayor concentración de glucosa, más desregulado se ve su consumo y mayor cantidad de lactato es sintetizado, forzando a la célula a consumir en mayor proporción la fuente de nitrógeno para alimentar al TCA y generando, consecuentemente, más amonio.

En particular para el medio Zell-C5, y contrariamente a lo observado para el lactato - el cual alcanzó niveles normales en sobrenadante (considerando la diferencia en la extensión de los cultivos) –, la acumulación de amonio en este medio fue extremadamente baja ($< 0,5$ mM) en todos los casos. No puede decirse que este fenómeno se deba a la utilización preferencial de la vía de transaminación del glutamato en detrimento de la desaminación a α -cetoglutarato, ya que no se observó un consumo significativo del glutamato, siendo la hipótesis más probable que la baja velocidad de ingreso de éste, sumado a la ausencia de los aminoácidos amoniogénicos glutamina y asparagina, redundara en una baja producción del ion amonio.

A diferencia de lo observado para la producción de lactato, la cinética de producción de amonio presentó en general gran variabilidad desde el inicio de los cultivos, excepto para el medio con mayor contenido de glutamina (Zell-C6), en el cual las pendientes

de las curvas fueron muy similares durante los dos primeros días de cultivo. De esta forma se concluye que cuando la glutamina se encuentra presente en el medio de cultivo, el amonio generado proviene predominantemente del metabolismo de aquélla, mientras que cuando este aminoácido es sustituido por glutamato y/o asparagina, la producción de amonio es dependiente de la composición de hexosas del medio de cultivo.

La cinética de producción y las concentraciones finales de rhEPO alcanzadas no mostraron tener relación, sin embargo, con la concentración de los azúcares presentes, observándose una gran variabilidad en los resultados. En cambio, con referencia al contenido de aminoácidos, se observó que los valores más altos de q_{rhEPO} fueron obtenidos en aquellos cultivos con mayor concentración de asparagina. Este hecho apoya la observación de Altamirano y col. (2006b), quienes informaron que la adición de asparagina resulta esencial para la producción y actividad biológica de otra proteína recombinante producida en células CHO, el t-PA.

A partir de las curvas presentadas se calcularon los valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} para las experiencias en los medios Zell-C4 (Tabla LI), Zell-C5 (Tabla LII), Zell-C6 (Tabla LIII), Zell-C7 (Tabla LIV) y Zell-C8 (Tabla LV).

6.4.3. Análisis del perfil de isoformas

Se determinó el patrón de glicofomas de la rhEPO producida por el clon B1A2 en las condiciones ensayadas, mediante IEF y densitometría de las bandas reveladas por *Western blot* de las muestras de sobrenadante purificadas y concentradas. La proporción relativa de las isoformas producidas en cada cultivo se presenta en las Tabla LVI (Zell-C4), Tabla LVII (Zell-C5), Tabla LVIII (Zell-C6), Tabla LIX (Zell-C7) y Tabla LX (Zell-C8). No se incluyen los datos correspondientes al cultivo S1-c del medio Zell-C4 debido a que la muestra probablemente se degradó durante la purificación, no siendo posible identificar isoformas definidas y cuantificables, y a los cultivos S1-b y S1-i, debido a que la masa de proteína recuperada fue insuficiente para obtener resultados confiables por IEF – *Western blot*. Esto último ocurrió en todas las condiciones ensayadas.

Posteriormente se obtuvieron los valores de AB_i , asociada a cada uno de los cultivos analizados por IEF, siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 2.

Tabla LI: Valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} obtenidos para las diferentes mezclas de hexosas adicionadas al medio Zell-C4.

Cultivo	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} ($\% 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)
S1-a	nd --- ----	Sin glc ---- ----	345±23 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	15±2 <i>R=0,93 P=0,0009</i>	Sin gln ---- ----	6±1 <i>R=0,88 P=0,009</i>	1,40±0,08 <i>R=0,99 P=0,003</i>
S1-b	nd ---- ----	Sin glc ---- ----	nd ---- ----	18±4 <i>R=0,88 P=0,004</i>	Sin gln ---- ----	11±1 <i>R=0,98 P=0,0006</i>	0,432±0,073 <i>R=0,92 P=0,001</i>
S1-c	0,0107±0,0008 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	238±42 <i>R=0,96 P=0,011</i>	268±51 <i>R=0,95 P=0,013</i>	15±1 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	Sin gln ---- ----	16±1 <i>R=0,99 P=0,0001</i>	0,888±0,057 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-d	0,0024±0,0004 <i>R=0,97 P=0,028</i>	56±6 <i>R=0,97 P=0,001</i>	nd --- ---	22±4 <i>R=0,92 P=0,002</i>	Sin gln ---- ----	8±1 <i>R=0,98 P=0,0005</i>	0,769±0,135 <i>R=0,93 P=0,002</i>
S1-e	0,0092±0,0009 <i>R=0,98 P=0,0004</i>	99±19 <i>R=0,96 P=0,036</i>	361±71 <i>R=0,98 P=0,114</i>	14±1 <i>R=0,98 P=0,0004</i>	Sin gln ---- ----	8±0,5 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	1,09±0,05 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-f	0,0111±0,0003 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	162±29 <i>R=0,96 P=0,011</i>	321±44 <i>R=0,98 P=0,019</i>	21±2 <i>R=0,98 P=0,0005</i>	Sin gln ---- ----	8±0,5 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	1,47±0,19 <i>R=0,97 P=0,002</i>
S1-g	0,0124±0,0001 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	113±17 <i>R=0,97 P=0,007</i>	386±59 <i>R=0,98 P=0,023</i>	39±1 <i>R=0,99 P=0,0003</i>	Sin gln ---- ----	17±1 <i>R=0,99 P=0,0001</i>	1,14±0,24 <i>R=0,94 P=0,017</i>
S1-h	0,0075±0,0006 <i>R=0,98 P<0,0001</i>	136±19 <i>R=0,97 P=0,005</i>	340±70 <i>R=0,96 P=0,040</i>	30±2 <i>R=0,99 P=0,004</i>	Sin gln ---- ----	11±0,3 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	0,908±0,105 <i>R=0,97 P=0,001</i>
S1-i	nd ---- ----	Sin glc ---- ----	nd ---- ----	31±5 <i>R=0,92 P=0,001</i>	Sin gln ---- ----	12±4 <i>R=0,81 P=0,026</i>	nd ---- ----
S1-j	0,0079±0,0002 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	Sin glc ---- ----	503±66 <i>R=0,98 P=0,017</i>	38±3 <i>R=0,99 P=0,0003</i>	Sin gln ---- ----	16±1 <i>R=0,99 P=0,0001</i>	0,733±0,036 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-k	0,0134±0,0006 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	210±28 <i>R=0,97 P=0,002</i>	371±66 <i>R=0,96 P=0,011</i>	53±8 <i>R=0,97 P=0,006</i>	Sin gln ---- ----	12±1 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	0,572±0,043 <i>R=0,98 P<0,0001</i>
S1-l	0,0083±0,0011 <i>R=0,95 P=0,0003</i>	Sin glc ---- ----	474±60 <i>R=0,98 P=0,016</i>	36±6 <i>R=0,95 P=0,003</i>	Sin gln ---- ----	14±0,4 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	0,792±0,083 <i>R=0,97 P<0,0001</i>
S1-m	0,004±0,001 <i>R=0,85 P=0,152</i>	190±30 <i>R=0,93 P=0,0007</i>	326±23 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	58±6 <i>R=0,98 P=0,0002</i>	Sin gln ---- ----	7±0,5 <i>R=0,99 P=0,0002</i>	0,352±0,048 <i>R=0,95 P=0,0003</i>

Tabla LII: Valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} obtenidos para las diferentes mezclas de hexosas adicionadas al medio Zell-C5.

Cultivo	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} ($\% 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)
S1-a	nd	Sin glc	233,2±20,2 <i>R=0,98</i>	12±8 <i>P=0,393</i>	Sin gln	nd	0,680±0,010 <i>R=0,99 P=0,008</i>
S1-b	nd	Sin glc	nd	59±30 <i>P=0,299</i>	Sin gln	nd	nd
S1-c	0,0112 <i>R=1 P<0,0001</i>	156±19 <i>R=0,96 P=0,0002</i>	271±33,9 <i>R=0,96</i>	9±2 <i>P=0,061</i>	Sin gln	nd	0,710±0,030 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-d	nd	54±11 <i>R=0,89 P=0,003</i>	363±40,0 <i>R=0,97</i>	Nd	Sin gln	nd	0,490±0,054 <i>R=0,97 P=0,0003</i>
S1-e	0,005±0,003 <i>R=0,87 P=0,331</i>	77±9 <i>R=0,96 P=0,0002</i>	251±27 <i>R=0,97</i>	9±4 <i>P=0,084</i>	Sin gln	nd	0,464±0,052 <i>R=0,97 P=0,0001</i>
S1-f	nd	131±36 <i>R=0,83 P=0,011</i>	273±44 <i>R=0,94</i>	13±0,2 <i>P=0,012</i>	Sin gln	nd	0,401±0,061 <i>R=0,95 P=0,001</i>
S1-g	nd	332±36 <i>R=0,99 P=0,068</i>	454,±54 <i>R=0,97</i>	9±4 <i>P=0,083</i>	Sin gln	nd	0,576±0,028 <i>R=0,99 P=0,0003</i>
S1-h	nd	228±38 <i>R=0,99 P=0,107</i>	244±21 <i>R=0,99</i>	7±5 <i>P=0,006</i>	Sin gln	nd	0,415±0,031 <i>R=0,99 P=0,0009</i>
S1-i	nd	Sin glc	nd	42±22 <i>P=0,153</i>	Sin gln	nd	nd
S1-j	nd	Sin glc	376±36 <i>R=0,97</i>	7±2 <i>P=0,037</i>	Sin gln	nd	0,643±0,103 <i>R=0,98 P=0,025</i>
S1-k	nd	184±20 <i>R=0,96 P=0,0001</i>	357±35 <i>R=0,98</i>	9±3 <i>P=0,065</i>	Sin gln	nd	0,796±0,167 <i>R=0,96 P=0,041</i>
S1-l	nd	Sin glc	442±40 <i>R=0,98</i>	6±1 <i>P=0,101</i>	Sin gln	nd	0,503±0,048 <i>R=0,98 P=0,0005</i>
S1-m	nd	214±23 <i>R=0,97 P=0,0002</i>	350±25 <i>R=0,98</i>	9±1 <i>P=0,008</i>	Sin gln	nd	0,848±0,173 <i>R=0,96 P=0,039</i>

Tabla LIII: Valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} obtenidos para las diferentes mezclas de hexosas adicionadas al medio Zell-C6.

Cultivo	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} ($\% 10^{-6}\ cél^{-1}\ h^{-1}$)
S1-a	0,0138±0,0004 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	Sin glc -----	551±50 <i>R=0,99 P=0,058</i>	55±7 <i>R=0,98 P=0,016</i>	96±13 <i>R=0,99 P=0,089</i>	24±7 <i>R=0,96 P=0,173</i>	0,500±0,021 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-b	nd -----	Sin glc -----	9±3 <i>R=0,84 P=0,078</i>	388±134 <i>R=0,90 P=0,101</i>	177±93 <i>R=0,74 P=0,153</i>	58±40 <i>R=0,64 P=0,241</i>	nd -----
S1-c	0,012±0,002 <i>R=0,98 P=0,017</i>	255±37 <i>R=0,98 P=0,020</i>	588±108 <i>R=0,98 P=0,116</i>	72±12 <i>R=0,97 P=0,026</i>	98±17 <i>R=0,98 P=0,111</i>	30±4 <i>R=0,99 P=0,079</i>	0,570±0,029 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-d	0,020±0,002 <i>R=0,99 P=0,007</i>	117±29 <i>R=0,97 P=0,156</i>	462±66 <i>R=0,98 P=0,019</i>	75±5 <i>R=0,99 P=0,005</i>	95±18 <i>R=0,97 P=0,033</i>	25±5 <i>R=0,97 P=0,032</i>	0,675±0,045 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-e	0,0154±0,0007 <i>R=0,99 P=0,0002</i>	169±34 <i>R=0,98 P=0,128</i>	508±107 <i>R=0,98 P=0,132</i>	60±7 <i>R=0,99 P=0,012</i>	95±13 <i>R=0,98 P=0,019</i>	28±3 <i>R=0,99 P=0,008</i>	0,530±0,033 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-f	0,0114±0,0006 <i>R=0,99 P=0,0003</i>	208±24 <i>R=0,98 P=0,003</i>	537±84 <i>R=0,98 P=0,023</i>	110±36 <i>R=0,95 P=0,199</i>	103±9 <i>R=0,99 P=0,008</i>	30±8 <i>R=0,94 P=0,060</i>	0,477±0,021 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-g	0,0107±0,0009 <i>R=0,99 P=0,001</i>	187±22 <i>R=0,99 P=0,014</i>	478±63 <i>R=0,97 P=0,005</i>	86±11 <i>R=0,97 P=0,002</i>	75±7 <i>R=0,99 P=0,002</i>	29±5 <i>R=0,96 P=0,008</i>	0,373±0,054 <i>R=0,94 P=0,0005</i>
S1-h	0,019±0,001 <i>R=0,99 P=0,007</i>	154±26 <i>R=0,97 P=0,026</i>	480±103 <i>R=0,96 P=0,043</i>	68±9 <i>R=0,98 P=0,019</i>	79±13 <i>R=0,97 P=0,026</i>	28±4 <i>R=0,98 P=0,021</i>	0,753±0,039 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-i	nd -----	Sin glc -----	nd -----	nd -----	nd -----	nd -----	nd -----
S1-j	0,018±0,003 <i>R=0,97 P=0,035</i>	Sin glc -----	616±130 <i>R=0,98 P=0,132</i>	102±19 <i>R=0,98 P=0,120</i>	94±11 <i>R=0,99 P=0,013</i>	19±2 <i>R=0,99 P=0,014</i>	0,861±0,113 <i>R=0,96 P=0,0007</i>
S1-k	0,016±0,003 <i>R=0,97 P=0,029</i>	452±17 <i>R=0,99 P=0,002</i>	616±128 <i>R=0,95 P=0,45</i>	88±20 <i>R=0,95 P=0,049</i>	118±25 <i>R=0,96 P=0,044</i>	26±6 <i>R=0,95 P=0,045</i>	1,31±0,1 <i>R=0,98 P<0,0001</i>
S1-l	0,016±0,004 <i>R=0,95 P=0,051</i>	Sin glc -----	585±111 <i>R=0,98 P=0,119</i>	86±17 <i>R=0,98 P=0,123</i>	90±15 <i>R=0,97 P=0,027</i>	17±1 <i>R=0,99 P=0,007</i>	0,732±0,119 <i>R=0,94 P=0,002</i>
S1-m	0,017±0,001 <i>R=0,99 P=0,004</i>	320±55 <i>R=0,97 P=0,28</i>	670±77 <i>R=0,99 P=0,073</i>	112±15 <i>R=0,99 P=0,087</i>	96±11 <i>R=0,97 P=0,013</i>	28±4 <i>R=0,98 P=0,019</i>	0,922±0,090 <i>R=0,99 P=0,002</i>

Tabla LIV: Valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} obtenidos para las diferentes mezclas de hexosas adicionadas al medio Zell-C7.

Cultivo	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)
S1-a	0,0058±0,0009 R=0,96 P=0,003	Sin glc -----	396±59 R=0,96 P=0,003	16±2 R=0,97 P=0,001	43±5 R=0,98 P=0,003	12±2 R=0,96 P=0,011	0,550±0,030 R=0,99 P<0,0001
S1-b	nd -----	Sin glc -----	nd -----	14±5 R=0,87 P=0,057	67±9 R=0,99 P=0,083	13±1 R=0,99 P=0,0002	nd -----
S1-c	0,0185±0,0008 R=0,99 P=0,097	289±57 R=0, P=0,	490±104 R=0,96 P=0,042	19±2 R=0,98 P=0,003	44±11 R=0,94 P=0,059	8±1 R=0,98 P=0,002	0,704±0,050 R=0,99 P<0,0001
S1-d	0,009±0,002 R=0,94 P=0,019	82±8 R=0,99 P=0,009	502±71 R=0,97 P=0,006	29±2 R=0,99 P=0,002	51±3 R=0,99 P=0,003	13±1 R=0,99 P<0,0001	0,720±0,041 R=0,99 P<0,0001
S1-e	0,019±0,008 R=0,92 P=0,260	199±43 R=0,96 P=0,044	558±55 R=0,99 P=0,002	34±3 R=0,98 P=0,002	45±6 R=0,96 P=0,002	17±4 R=0,97 P=0,156	0,814±0,071 R=0,98 P<0,0001
S1-f	0,008±0,002 R=0,91 P=0,035	187±14 R=0,99 P=0,049	531±67 R=0,98 P=0,004	28±2 R=0,98 P=0,0004	35±7 R=0,95 P=0,013	15±3 R=0,97 P=0,027	0,656±0,048 R=0,98 P<0,0001
S1-g	0,011±0,001 R=0,98 P=0,003	189±34 R=0,97 P=0,031	623±123 R=0,96 P=0,037	47±5 R=0,99 P=0,010	41±4 R=0,99 P=0,002	18±3 R=0,97 P=0,033	0,513±0,037 R=0,98 P<0,0001
S1-h	0,010±0,002 R=0,97 P=0,035	219±11 R=0,99 P=0,0003	480±130 R=0,93 P=0,066	103±22 R=0,98 P=0,134	32±6 R=0,95 P=0,014	13±1 R=0,99 P=0,0009	0,628±0,052 R=0,98 P<0,0001
S1-i	---- -----	---- -----	---- -----	---- -----	---- -----	---- -----	---- -----
S1-j	0,012±0,001 R=0,99 P=0,006	Sin glc -----	719±12 R=0,99 P=0,011	44±6 R=0,96 P=0,002	35±4 R=0,98 P=0,004	13±2 R=0,98 P=0,004	0,616±0,056 R=0,98 P<0,0001
S1-k	0,011±0,001 R=0,98 P=0,0007	659±10 R=0,99 P=0,010	517±70 R=0,98 P=0,018	43±7 R=0,97 P=0,027	32±6 R=0,96 P=0,011	10±1 R=0,99 P=0,080	0,662±0,086 R=0,95 P=0,0003
S1-l	0,014±0,008 R=0,87 P=0,322	Sin glc -----	539±33 R=0,99 P=0,0005	nd -----	35±3 R=0,99 P=0,0002	14±1 R=0,99 P=0,002	0,452±0,073 R=0,93 P=0,0008
S1-m	0,014±0,002 R=0,96 P=0,010	609±95 R=0,99 P=0,098	634±12 R=0,94 P=0,057	53±8 R=0,97 P=0,025	49±9 R=0,97 P=0,033	8±1 R=0,98 P=0,016	0,792±0,086 R=0,97 P<0,0001

Tabla LV: Valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{gln} , q_{glu} , q_{am} y q_{rhEPO} obtenidos para las diferentes mezclas de hexosas adicionadas al medio Zell-C8.

Cultivo	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)
S1-a	0,012±0,001 <i>R=0,98 P=0,0008</i>	Sin glc -----	376±69 <i>R=0,97 P=0,032</i>	24±7 <i>R=0,93 P=0,072</i>	Sin gln -----	10±3 <i>R=0,93 P=0,069</i>	1,25±0,09 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-b	nd -----	Sin glc -----	nd -----	34±3 <i>R=0,98 P<0,0001</i>	Sin gln -----	nd -----	0,244±0,028 <i>R=0,96 P=0,0002</i>
S1-c	0,018±0,004 <i>R=0,95 P=0,048</i>	226±35 <i>R=0,97 P=0,008</i>	452±93 <i>R=0,96 P=0,040</i>	27±4 <i>R=0,98 P=0,018</i>	Sin gln -----	5±1 <i>R=0,92 P=0,002</i>	0,639±0,052 <i>R=0,98 P<0,0001</i>
S1-d	0,010±0,001 <i>R=0,98 P=0,0005</i>	88±10 <i>R=0,99 P=0,013</i>	313±60 <i>R=0,95 P=0,014</i>	34±1 <i>R=0,99 P=0,001</i>	Sin gln -----	11±2 <i>R=0,96 P=0,037</i>	1,45±0,25 <i>R=0,94 P=0,005</i>
S1-e	0,0100±0,0007 <i>R=0,99 P=0,0009</i>	133±26 <i>R=0,96 P=0,035</i>	532±88 <i>R=0,99 P=0,104</i>	18±3 <i>R=0,97 P=0,034</i>	Sin gln -----	8±2 <i>R=0,94 P=0,016</i>	0,741±0,045 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-f	0,011±0,001 <i>R=0,99 P=0,002</i>	200±31 <i>R=0,97 P=0,007</i>	532±76 <i>R=0,98 P=0,020</i>	41±4 <i>R=0,99 P=0,009</i>	Sin gln -----	6±0,5 <i>R=0,99 P=0,001</i>	1,03±0,04 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-g	0,014±0,002 <i>R=0,98 P=0,015</i>	143±21 <i>R=0,98 P=0,022</i>	403±71 <i>R=0,97 P=0,030</i>	31±3 <i>R=0,99 P=0,010</i>	Sin gln -----	12±2 <i>R=0,96 P=0,008</i>	1,10±0,06 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-h	0,011±0,001 <i>R=0,97 P=0,001</i>	138±18 <i>R=0,97 P=0,005</i>	457±62 <i>R=0,98 P=0,018</i>	37±4 <i>R=0,99 P=0,014</i>	Sin gln -----	15±2 <i>R=0,99 P=0,100</i>	1,08±0,07 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-i	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S1-j	0,016±0,003 <i>R=0,98 P=0,025</i>	Sin glc -----	418±77 <i>R=0,97 P=0,030</i>	43±5 <i>R=0,99 P=0,012</i>	Sin gln -----	38±10 <i>R=0,97 P=0,164</i>	0,603±0,039 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-k	0,011±0,002 <i>R=0,96 P=0,009</i>	317±38 <i>R=0,99 P=0,014</i>	469±90 <i>R=0,97 P=0,035</i>	38±4 <i>R=0,99 P=0,012</i>	Sin gln -----	49±18 <i>R=0,94 P=0,229</i>	1,05±0,16 <i>R=0,95 P=0,001</i>
S1-l	0,020±0,003 <i>R=0,98 P=0,017</i>	Sin glc -----	501±151 <i>R=0,92 P=0,080</i>	46±13 <i>R=0,93 P=0,072</i>	Sin gln -----	6±1 <i>R=0,97 P=0,0004</i>	0,934±0,042 <i>R=0,99 P<0,0001</i>
S1-m	0,0126±0,0006 <i>R=0,99 P<0,0001</i>	368±29 <i>R=0,99 P=0,006</i>	514±51 <i>R=0,99 P=0,010</i>	44±3 <i>R=0,99 P=0,004</i>	Sin gln -----	5±1 <i>R=0,98 P=0,004</i>	0,751±0,082 <i>R=0,97 P<0,0001</i>

Tabla LVI: Proporción relativa de las isoformas de rhEPO producidas por el clon B1A2 cultivado en el medio Zell-C4, para las distintas mezclas de hexosas.

Isoforma	S1-a	S1-b	S1-c	S1-d	S1-e	S1-f	S1-g	S1-h	S1-i	S1-j	S1-k	S1-l	S1-m
-3	4,1	nd	nd	2,6	1,8	0,7	6,2	0,8	nd	4,3	8,0	1,8	0,5
-2	6,6	nd	nd	7,4	6,9	3,7	2,7	3,8	nd	0,2	6,1	1,8	6,8
-1	7,4	nd	nd	10,3	10,3	11,2	6,5	7,6	nd	1,5	13,6	7,3	11,3
0	10,8	nd	nd	15,7	15,9	12,3	13,0	10,3	nd	5,6	2,1	12,8	15,2
1	19,6	nd	nd	18,9	16,5	15,2	19,9	14,6	nd	12,1	7,8	18,5	17,8
2	19,8	nd	nd	21,1	15,8	15,4	22,9	13,7	nd	15,0	16,3	20,5	18,5
3	18,9	nd	nd	18,2	15,7	18,8	23,5	14,1	nd	16,3	23,7	17,9	16,8
4	12,8	nd	nd	5,7	9,8	15,5	5,2	16,1	nd	19,7	17,8	12,8	10,9
5	ND	nd	nd	0,1	7,2	6,1	ND	13,3	nd	17,4	4,5	5,5	2,6
6	ND	nd	nd	ND	ND	1,2	ND	5,6	nd	7,8	ND	1,1	ND
7	ND												
8	ND												

Tabla LVII: Proporción relativa de las isoformas de rhEPO producidas por el clon B1A2 cultivado en el medio Zell-C5, para las distintas mezclas de hexosas.

Isoforma	S1-a	S1-b	S1-c	S1-d	S1-e	S1-f	S1-g	S1-h	S1-i	S1-j	S1-k	S1-l	S1-m
-3	4,2	nd	4,1	3,6	3,0	1,4	6,1	1,2	nd	4,4	5,0	17,1	0,2
-2	8,7	nd	8,3	6,9	9,3	6,3	9,4	8,5	nd	7,0	7,7	18,5	3,6
-1	11,7	nd	9,6	8,7	13,4	6,4	11,5	9,5	nd	8,7	7,1	20,9	11,6
0	14,1	nd	13,0	11,3	18,0	11,6	13,0	9,0	nd	10,4	8,5	11,5	16,7
1	15,2	nd	15,2	14,6	17,0	14,9	13,2	9,0	nd	13,9	12,0	10,3	16,1
2	15,6	nd	15,5	15,5	16,6	15,1	13,3	13,9	nd	14,2	14,0	7,8	14,7
3	14,4	nd	14,4	15,6	13,9	14,9	10,5	15,2	nd	13,3	14,3	4,6	16,9
4	11,3	nd	11,5	13,2	8,9	13,2	10,2	15,2	nd	13,0	14,3	3,0	12,0
5	4,7	nd	6,6	8,4	ND	11,2	12,7	11,8	nd	9,6	11,4	0,8	8,4
6	ND	nd	1,6	2,1	ND	4,9	ND	6,8	nd	5,2	5,5	1,0	ND
7	ND	0,2	ND	3,6	ND								
8	ND	1,0	ND										

Tabla LVIII: Proporción relativa de las isoformas de rhEPO producidas por el clon B1A2 cultivado en el medio Zell-C6, para las distintas mezclas de hexosas.

Isoforma	S1-a	S1-b	S1-c	S1-d	S1-e	S1-f	S1-g	S1-h	S1-i	S1-j	S1-k	S1-l	S1-m
-3	3,6	nd	4,7	2,7	8,1	13,9	22,2	0,5	nd	3,1	0,2	0,6	0,1
-2	8,7	nd	4,6	6,0	9,5	7,5	7,8	16,4	nd	5,7	2,2	2,1	0,7
-1	14,1	nd	9,7	8,7	12,8	9,1	10,8	5,9	nd	6,3	6,4	6,2	4,7
0	16,5	nd	14,0	12,4	14,8	11,2	15,2	6,6	nd	12,6	10,9	10,8	10,9
1	18,5	nd	17,9	15,6	16,3	12,8	17,0	12,1	nd	15,7	14,9	15,2	15,7
2	17,5	nd	19,0	15,5	15,9	12,8	15,8	16,7	nd	18,9	18,8	19,8	18,0
3	13,4	nd	18,2	15,9	13,7	12,9	9,8	19,8	nd	17,9	20,8	20,8	20,3
4	6,8	nd	10,6	13,7	7,6	11,0	1,4	15,7	nd	15,5	17,2	17,7	18,5
5	0,9	nd	1,3	8,4	1,3	7,2	ND	6,0	nd	4,3	8,3	6,8	11,1
6	ND	nd	ND	1,0	ND	1,7	ND	0,4	nd	ND	0,3	ND	ND
7	ND												
8	ND												

Tabla LIX: Proporción relativa de las isoformas de rhEPO producidas por el clon B1A2 cultivado en el medio Zell-C7, para las distintas mezclas de hexosas.

Isoforma	S1-a	S1-b	S1-c	S1-d	S1-e	S1-f	S1-g	S1-h	S1-i	S1-j	S1-k	S1-l	S1-m
-3	0,6	nd	0,3	1,1	4,7	2,8	4,9	10,4	nd	9,7	6,9	11,6	7,3
-2	7,1	nd	6,6	6,3	12,0	5,9	1,4	9,2	nd	8,7	7,3	9,2	4,2
-1	13,9	nd	11,4	10,2	14,6	9,3	6,2	11,9	nd	15,0	11,1	10,6	6,0
0	12,0	nd	11,0	8,8	13,8	11,9	11,7	8,3	nd	10,6	9,1	9,6	10,2
1	12,6	nd	10,5	7,5	12,4	16,0	14,7	11,2	nd	10,8	10,3	11,1	13,6
2	12,7	nd	12,3	10,6	10,7	16,6	17,2	12,9	nd	12,6	11,9	11,8	15,6
3	12,1	nd	14,3	15,4	7,6	17,1	17,8	13,8	nd	13,2	13,1	12,6	15,9
4	13,0	nd	12,2	17,1	4,3	13,2	13,5	13,0	nd	11,8	13,1	12,0	12,2
5	11,3	nd	10,1	15,0	5,4	6,7	8,7	8,3	nd	4,5	11,3	9,2	11,4
6	4,4	nd	8,8	7,3	9,4	0,5	3,9	1,0	nd	3,1	5,3	2,3	3,7
7	0,3	nd	2,4	0,5	5,1	ND	ND	ND	nd	ND	0,8	ND	ND
8	ND	nd	0,1	ND									

Tabla LX: Proporción relativa de las isoformas de rhEPO producidas por el clon B1A2 cultivado en el medio Zell-C8, para las distintas mezclas de hexosas.

Isoforma	S1-a	S1-b	S1-c	S1-d	S1-e	S1-f	S1-g	S1-h	S1-i	S1-j	S1-k	S1-l	S1-m
-3	7,7	nd	1,3	12,3	8,2	2,1	7,3	8,3	nd	2,5	0,5	0,1	4,8
-2	9,0	nd	3,4	4,5	5,6	4,9	11,0	3,5	nd	4,5	1,6	1,5	5,3
-1	10,7	nd	7,8	8,8	10,0	9,8	10,6	6,1	nd	6,7	3,8	5,2	7,7
0	14,1	nd	15,3	13,3	17,1	13,3	12,0	12,5	nd	10,1	8,1	11,1	10,1
1	17,2	nd	20,4	10,1	20,5	17,3	15,0	19,5	nd	13,1	14,1	16,5	12,6
2	16,9	nd	19,8	5,9	21,3	19,5	15,4	17,7	nd	15,9	18,3	20,1	14,5
3	15,6	nd	18,7	19,1	17,4	19,6	15,9	15,7	nd	18,5	19,9	22,1	16,7
4	8,4	nd	11,6	16,1	ND	11,9	10,7	12,4	nd	18,5	21,1	20,7	16,8
5	0,4	nd	1,6	9,8	ND	1,6	2,1	4,3	nd	9,7	11,7	2,6	10,6
6	ND	0,5	1,1	ND	ND								
7	ND												
8	ND												

La inferencia de conclusiones a partir de las observaciones que se realizan sobre un número tan grande de resultados experimentales resulta incompleta, ya que se pierde mucha información al no poder cruzar todas las variables en estudio. En estos casos se requiere de un análisis sistemático y dirigido, que permita describir la realidad experimental en forma apropiada, y generar así información que facilite la toma de decisiones.

Como el objetivo final de este último conjunto de experimentos fue el de utilizarlos en el diseño de un medio de cultivo que optimizase ciertos parámetros previamente elegidos, se analizaron los datos obtenidos mediante la *metodología de superficies de respuesta*, definiéndose así un medio de cultivo mejorado para la producción de rhEPO en un proceso productivo en modo de cultivo por lote.

6.4.4. Modelado de respuestas mediante RSM

Los objetivos del análisis de los datos experimentales a través de la metodología de superficies de respuesta fueron:

- Evaluar el comportamiento de cada una de las respuestas seleccionadas frente a diferentes combinaciones de los seis componentes del medio de cultivo en estudio.
- Predecir las proporciones óptimas de estos compuestos en el medio de cultivo, que al ser adicionadas al medio basal permitirían obtener los mejores resultados (de acuerdo con las exigencias impuestas a las respuestas elegidas) en un cultivo por lote del clon B1A2.

En primer lugar se seleccionaron las respuestas de interés a ser incluidas en el análisis.

Teniendo en cuenta que se desea formular un medio a ser utilizado durante el cultivo del clon B1A2 para la producción por lote de rhEPO, se eligieron las siguientes respuestas del sistema a ser optimizadas:

- **ICV:**

Como se ha mencionado anteriormente, la ICV es una medida de la cantidad de células metabólicamente activas que se encuentran durante todo el período de cultivo de las mismas. Debido a que la rhEPO es una proteína secretada constitutivamente por las células durante su vida, y su secreción no se encuentra asociada a una fase del ciclo celular en particular, la maximización de la ICV es uno de los objetivos a ser perseguidos durante el cultivo por lote.

- **q_{rhEPO} :**

Los resultados obtenidos hasta aquí han demostrado que la calidad glicosídica de

la molécula de rhEPO no depende, al menos directamente, de su velocidad específica de producción. Por esta razón es también deseable que este parámetro alcance el valor más alto posible durante el cultivo.

- **q_{lac} :**

Tratándose de un metabolito que rápidamente baja el pH del medio en un cultivo por lote y cuya acumulación resulta perjudicial para las células, se procura que su velocidad específica de producción sea mínima.

- **q_{am} :**

Se ha demostrado ya el efecto perjudicial de la acumulación de amonio en el sobrenadante de cultivo sobre el patrón de isoformas de rhEPO producido, por lo que se requiere que la combinación de los nutrientes en estudio no induzcan una rápida secreción de este metabolito, con el fin de disminuir cuanto sea posible los niveles alcanzados al final del cultivo.

- **Actividad biológica específica:**

Es el objetivo primordial del presente trabajo el obtener una molécula de rhEPO con alta actividad biológica específica a través de la selección de las condiciones de cultivo del clon productor.

En la Tabla LXI se presentan las respuestas obtenidas en los 65 experimentos realizados, correspondientes al diseño de mezclas cruzadas que se mostró en la Fig. 46.

Tabla LXI: Respuestas obtenidas en cada punto del diseño experimental de mezclas cruzadas.

Experimento		ICV (cél h ml ⁻¹)	q_{rhEPO} (% cél ⁻¹ h ⁻¹)	AB _t (UI mg ⁻¹)	q_{lac} q_{am} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	
Punto S1	Punto S2					
S1-a	S2-a	1,97 × 10 ⁷	1,40 × 10 ⁻⁶	35.700	345	15
S1-b	S2-a	1,58 × 10 ⁷	4,32 × 10 ⁻⁷	–	0	18
S1-c	S2-a	1,10 × 10 ⁸	8,88 × 10 ⁻⁷	–	269	15
S1-d	S2-a	4,66 × 10 ⁷	7,69 × 10 ⁻⁷	29.400	–	22
S1-e	S2-a	9,54 × 10 ⁷	1,09 × 10 ⁻⁶	39.100	360	14
S1-f	S2-a	1,32 × 10 ⁸	1,47 × 10 ⁻⁶	45.900	321	21
S1-g	S2-a	1,33 × 10 ⁸	1,14 × 10 ⁻⁶	53.500	386	39
S1-h	S2-a	1,19 × 10 ⁸	9,08 × 10 ⁻⁷	59.600	340	30
S1-i	S2-a	1,07 × 10 ⁷	–	–	–	31
S1-j	S2-a	7,90 × 10 ⁷	7,33 × 10 ⁻⁷	72.800	503	38

S1-k	S2-a	$1,21 \times 10^8$	$5,72 \times 10^{-7}$	44.800	371	53
S1-l	S2-a	$8,86 \times 10^7$	$7,92 \times 10^{-7}$	–	474	36
S1-m	S2-a	$3,98 \times 10^7$	$3,52 \times 10^{-7}$	44.400	326	58
S1-a	S2-b	$3,72 \times 10^7$	$6,80 \times 10^{-7}$	35.800	233	12
S1-b	S2-b	$4,32 \times 10^6$	–	–	–	59
S1-c	S2-b	$3,25 \times 10^7$	$7,10 \times 10^{-7}$	40.900	271	9
S1-d	S2-b	$2,68 \times 10^7$	$4,90 \times 10^{-7}$	46.200	363	–
S1-e	S2-b	$3,54 \times 10^7$	$4,64 \times 10^{-7}$	27.900	251	9
S1-f	S2-b	$3,65 \times 10^7$	$4,01 \times 10^{-7}$	54.000	273	13
S1-g	S2-b	$2,65 \times 10^7$	$5,76 \times 10^{-7}$	41.900	454	9
S1-h	S2-b	$3,69 \times 10^7$	$4,15 \times 10^{-7}$	57.800	244	7
S1-i	S2-b	$3,44 \times 10^7$	–	–	–	42
S1-j	S2-b	$2,97 \times 10^7$	$6,43 \times 10^{-7}$	50.700	376	7
S1-k	S2-b	$3,18 \times 10^7$	$7,96 \times 10^{-7}$	54.600	357	9
S1-l	S2-b	$2,94 \times 10^7$	$5,03 \times 10^{-7}$	47.800	442	6
S1-m	S2-b	$2,78 \times 10^7$	$8,48 \times 10^{-7}$	43.100	350	9
S1-a	S2-c	$1,01 \times 10^8$	$5,00 \times 10^{-7}$	27.400	551	55
S1-b	S2-c	–	–	–	9	–
S1-c	S2-c	$1,00 \times 10^8$	$5,70 \times 10^{-7}$	34.500	588	72
S1-d	S2-c	$9,85 \times 10^7$	$6,75 \times 10^{-7}$	45.500	462	75
S1-e	S2-c	$1,07 \times 10^8$	$5,30 \times 10^{-7}$	27.600	508	60
S1-f	S2-c	$8,81 \times 10^7$	$4,77 \times 10^{-7}$	38.900	537	110
S1-g	S2-c	$4,10 \times 10^7$	$3,73 \times 10^{-7}$	17.800	478	86
S1-h	S2-c	$9,26 \times 10^7$	$7,53 \times 10^{-7}$	44.500	480	68
S1-i	S2-c	–	–	–	–	–
S1-j	S2-c	$1,03 \times 10^8$	$8,61 \times 10^{-7}$	42.400	616	102
S1-k	S2-c	$9,12 \times 10^7$	$1,31 \times 10^{-6}$	51.300	616	88
S1-l	S2-c	$1,07 \times 10^8$	$7,32 \times 10^{-7}$	49.700	585	86
S1-m	S2-c	$1,05 \times 10^8$	$9,22 \times 10^{-7}$	55.400	670	112
S1-a	S2-d	$5,60 \times 10^7$	$5,50 \times 10^{-7}$	50.700	396	16
S1-b	S2-d	$3,63 \times 10^7$	–	–	–	14
S1-c	S2-d	$6,74 \times 10^7$	$7,04 \times 10^{-7}$	59.600	490	19
S1-d	S2-d	$7,17 \times 10^7$	$7,20 \times 10^{-7}$	64.500	502	29
S1-e	S2-d	$4,71 \times 10^7$	$8,14 \times 10^{-7}$	47.700	558	34
S1-f	S2-d	$7,00 \times 10^7$	$6,56 \times 10^{-7}$	43.100	531	28
S1-g	S2-d	$7,56 \times 10^7$	$5,13 \times 10^{-7}$	51.700	623	47
S1-h	S2-d	$8,50 \times 10^7$	$6,28 \times 10^{-7}$	41.200	480	103
S1-i	S2-d	–	–	–	–	–
S1-j	S2-d	$7,15 \times 10^7$	$6,16 \times 10^{-7}$	37.800	719	44
S1-k	S2-d	$9,62 \times 10^7$	$6,62 \times 10^{-7}$	52.500	517	43
S1-l	S2-d	$5,30 \times 10^7$	$4,52 \times 10^{-7}$	42.400	539	–
S1-m	S2-d	$1,24 \times 10^8$	$7,92 \times 10^{-7}$	51.700	634	53
S1-a	S2-e	$1,14 \times 10^8$	$1,25 \times 10^{-7}$	28.700	376	24
S1-b	S2-e	$2,59 \times 10^7$	$2,44 \times 10^{-7}$	–	–	34
S1-c	S2-e	$1,01 \times 10^8$	$6,39 \times 10^{-7}$	37.100	452	27

S1-d	S2-e	$1,07 \times 10^8$	$1,45 \times 10^{-6}$	38.500	313	34
S1-e	S2-e	$9,79 \times 10^7$	$7,41 \times 10^{-7}$	24.000	532	18
S1-f	S2-e	$1,03 \times 10^8$	$1,03 \times 10^{-6}$	37.100	532	41
S1-g	S2-e	$1,10 \times 10^8$	$1,10 \times 10^{-6}$	32.200	403	31
S1-h	S2-e	$1,20 \times 10^8$	$1,08 \times 10^{-6}$	50.500	457	37
S1-i	S2-e	–	–	–	–	–
S1-j	S2-e	$1,20 \times 10^8$	$6,03 \times 10^{-7}$	51.900	418	43
S1-k	S2-e	$1,08 \times 10^8$	$1,05 \times 10^{-6}$	59.700	469	38
S1-l	S2-e	$1,24 \times 10^8$	$9,34 \times 10^{-7}$	48.000	501	46
S1-m	S2-e	$1,26 \times 10^8$	$7,51 \times 10^{-7}$	56.500	514	44

6.4.5. Estudio de las respuestas: análisis simple

Utilizando el programa de diseño estadístico de experimentos *Design Expert*® v.6.0.10 (Stat-Ease, Inc., EE.UU.) se realizó en primera instancia una prueba para descartar valores anómalos (comúnmente conocidos como *outliers*), que pudieran influenciar el modelo (Myers y Montgomery, 1995). Ninguno de los 65 experimentos fue descartado por esta prueba.

Considerando una dada combinación de los aminoácidos glutamina, glutamato y asparagina, se ajustó un modelo polinómico (y su correspondiente superficie) para cada respuesta analizada, sobre el sistema coordinado *simplex* asociado al diseño S1. La superficie obtenida predice los valores de la respuesta para las infinitas combinaciones de glucosa, galactosa y manosa que satisfagan los requerimientos de la mezcla, para este punto experimental del diseño S2 en particular.

Este procedimiento se repitió entonces en cada uno de los puntos del diseño S2, obteniéndose las respectivas superficies. El modelo seleccionado para cada respuesta fue el polinomio de mayor orden en el cual los términos eran significativos, y era posible identificar los efectos de los factores individuales sin que éstos se confundieran entre sí.

Los modelos obtenidos para las respuestas ICV, q_{rhEPO} , actividad biológica específica (AB_t), q_{lac} y q_{am} se presentan en la Tabla LXII. Se incluyen además los valores F y P del modelo, así como los valores F y P de la *prueba de falta de ajuste* (*Lack of Fit test*, *LOF*). Si el valor F del modelo es superior al valor tabulado se rechaza la hipótesis nula respecto a los coeficientes del modelo, en tanto si el valor F de la prueba *LOF* es menor al valor de tabla, no hay evidencia de una falta de ajuste significativa del modelo ajustado.

Una forma alternativa de analizar el ajuste es a través de los valores P asociados a los estadísticos F . El valor P del modelo indica la probabilidad de que modelo ajustado se deba al azar o a la influencia del denominado *ruido experimental* (valores espurios). Se espera que este valor sea menor a 0,05 de forma que el modelo sea significativo desde el

punto de vista estadístico. Siguiendo un razonamiento análogo es deseable que valor P de la prueba LOF sea superior a 0,05, lo que indicaría que la falta de ajuste no es significativa con respecto al error experimental.

Tabla LXII: Modelos ajustados para las respuestas ICV, q_{rhEPO} , AB_t , q_{lac} y q_{am} , con sus respectivos valores F y P , así como los valores F y P del LOF.

		ICV	q_{rhEPO}	AB_t	q_{lac}	q_{am}
S2-a	Modelo Ajustado	cuadrático	cuadrático	lineal	cuadrático	cúbico S ^a
	Valor F (modelo)	3,58	3,45	5,23	11,35	4,56
	Valor P (modelo)	0,0632	0,0688	0,0408	0,0030	0,0437
	Valor F (LOF)	0,83	12,13	1429,96	14,37	3,42
	Valor P (LOF)	0,5854	0,0339	0,0202	0,0268	0,1699
S2-b	Modelo Ajustado	cuadrático	cuadrático	lineal	cúbico S ^a	cuadrático
	Valor F (modelo)	6,04	14,34	10,48	18,92	12,42
	Valor P (modelo)	0,0177	0,0015	0,0058	0,0012	0,0023
	Valor F (LOF)	24,82	4,22	0,69	4,69	0,93
	Valor P (LOF)	0,0123	0,1333	0,6929	0,1183	0,5465
S2-c	Modelo Ajustado	cúbico S ^a	lineal	lineal	cuadrático	cuadrático
	Valor F (modelo)	2,40	10,60	7,88	12,48	7,50
	Valor P (modelo)	0,1777	0,0043	0,0129	0,0040	0,0146
	Valor F (LOF)	19,09	0,87	3,93	6,71	14,54
	Valor P (LOF)	0,0502	0,6309	0,2165	0,1338	0,0654
S2-d	Modelo Ajustado	lineal	cuadrático	lineal	lineal	lineal
	Valor F (modelo)	21,29	2,58	0,44	5,15	3,56
	Valor P (modelo)	0,0004	0,1396	0,6575	0,0323	0,0728
	Valor F (LOF)	0,25	3,18	9,83	1,73	0,29
	Valor P (LOF)	0,9303	0,2530	0,0952	0,4139	0,9088
S2-e	Modelo Ajustado	cuadrático	cuadrático	lineal	lineal	cuadrático
	Valor F (modelo)	11,18	6,64	24,93	3,60	5,34
	Valor P (modelo)	0,0053	0,0196	0,0004	0,0711	0,0325
	Valor F (LOF)	1,59	0,39	4,64	8,20	2,54
	Valor P (LOF)	0,4212	0,8102	0,1878	0,1130	0,3017

^aLa expresión *cúbico S* hace referencia al modelo cúbico especial.

Los gráficos de contorno de las superficies de respuesta obtenidas, dependientes de la combinación de hexosas, para cada mezcla de los aminoácidos evaluada en el diseño S2 se muestran en las Fig. 55 (ICV), Fig. 56 (q_{rhEPO}), Fig. 57 (AB_t), Fig. 58 (q_{lac}) y Fig. 59 (q_{am}). En el sistema de coordenadas *simplex* las hexosas se indican como H1 (glucosa), H2 (galactosa) y H3 (manosa).

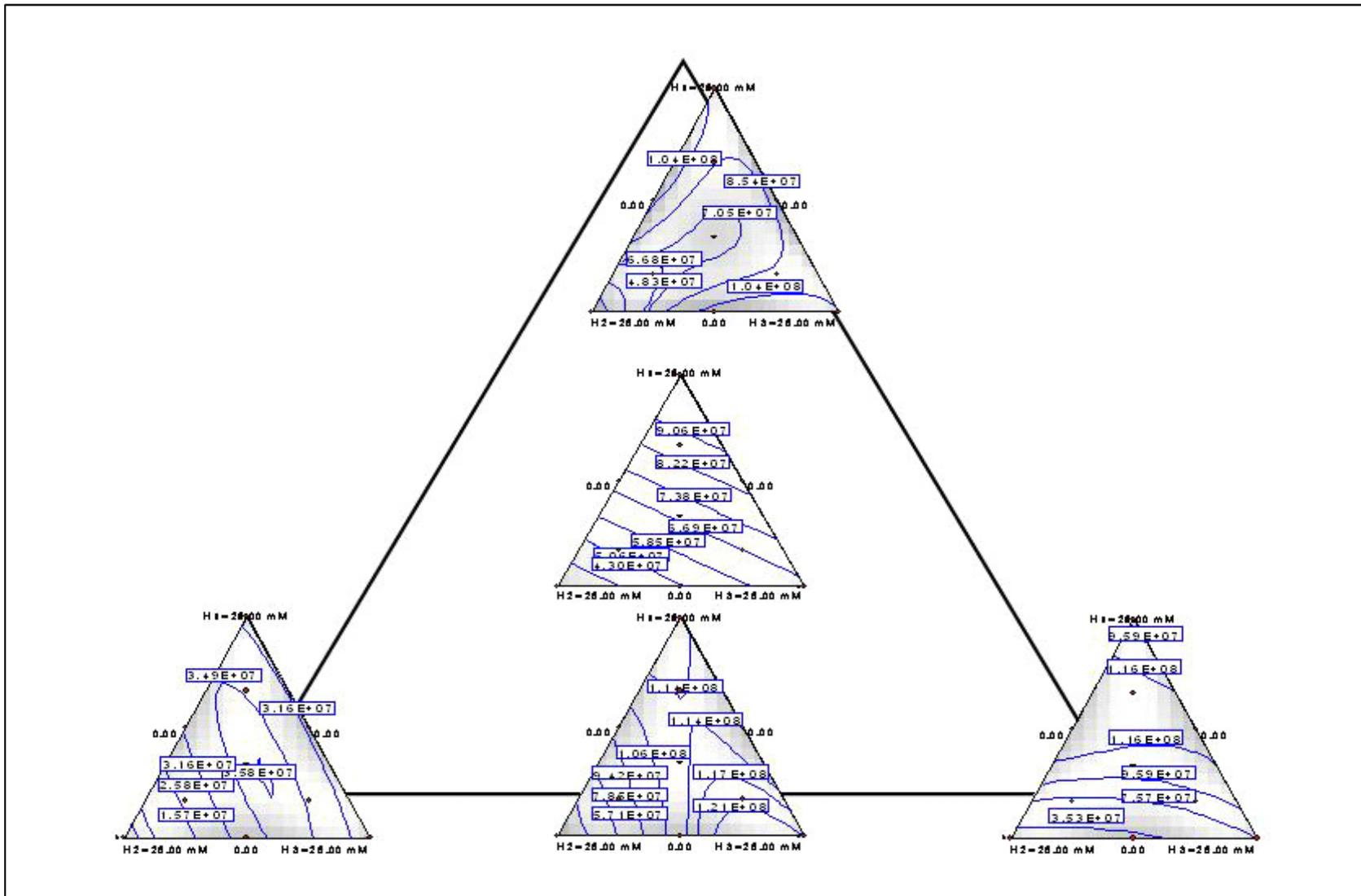


Fig. 55: Gráficos de contorno de las superficies obtenidas para la respuesta ICV en cada punto del diseño S2, dependientes de la combinación de hexosas.

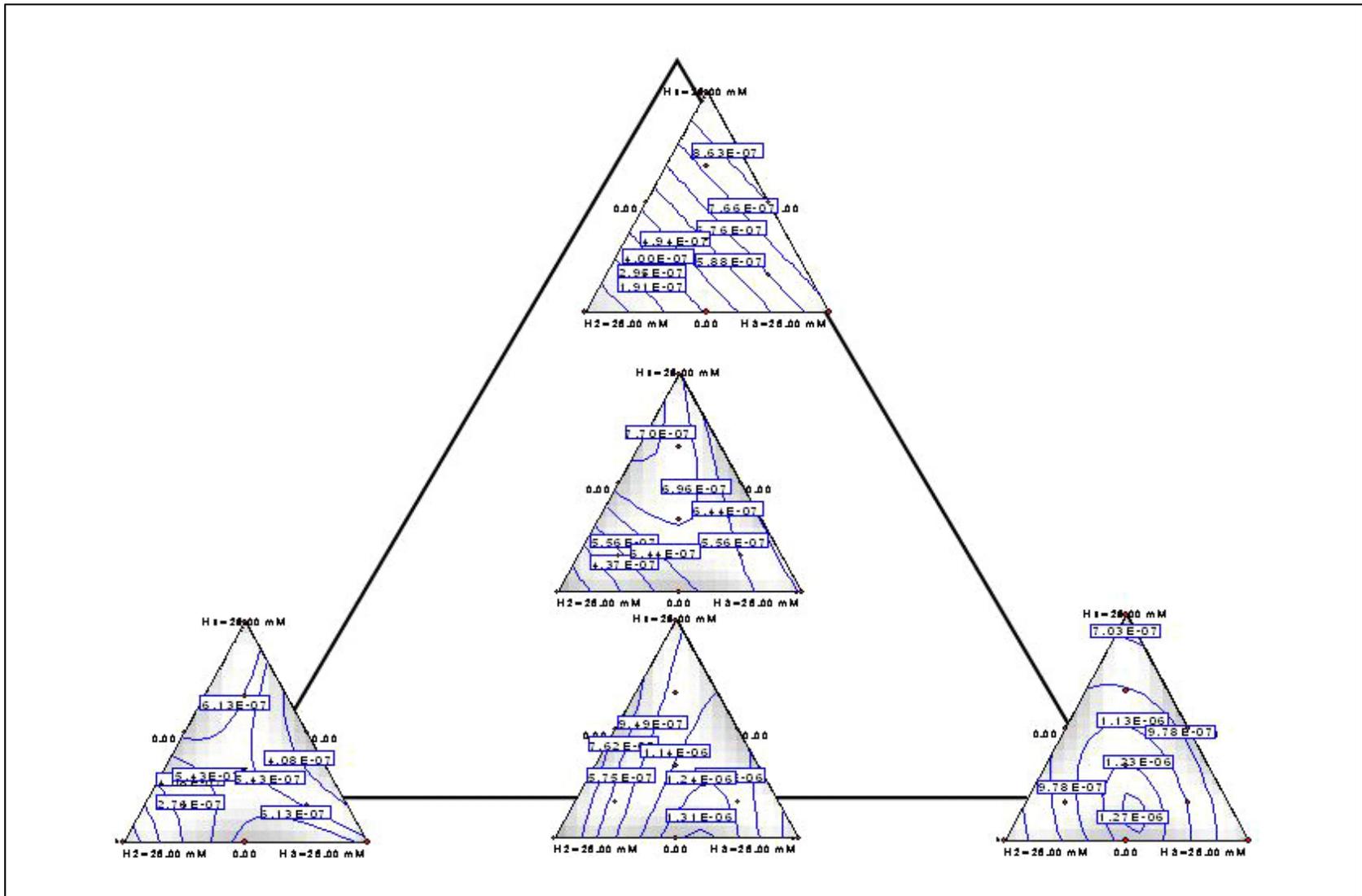


Fig. 56: Gráficos de contorno de las superficies obtenidas para la respuesta q_{ThEPO} en cada punto del diseño S2, dependientes de la combinación de hexosacos.

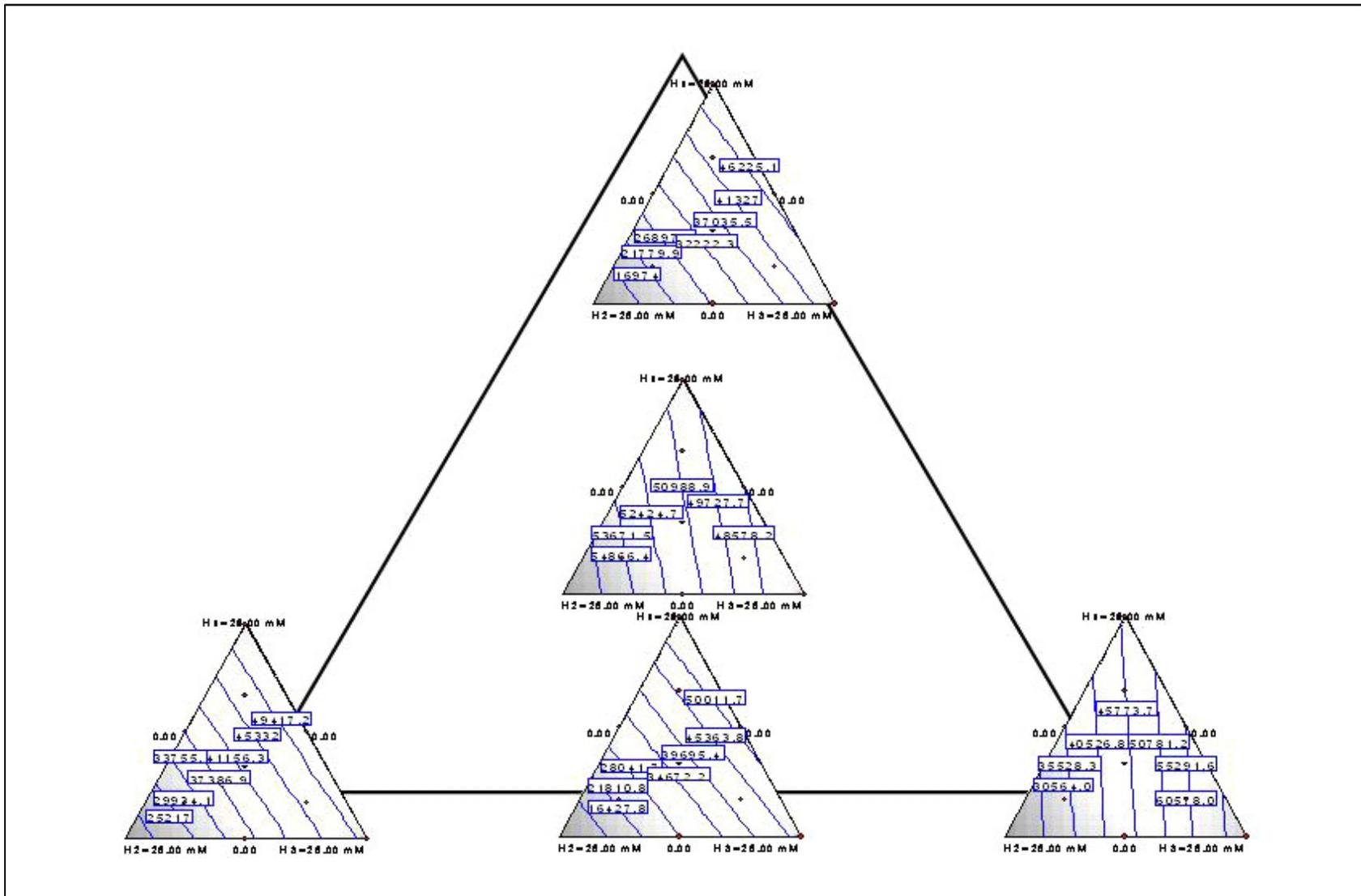


Fig. 57: Gráficos de contorno de las superficies obtenidas para la respuesta AB_i en cada punto del diseño S2, dependientes de la combinación de hexosas.

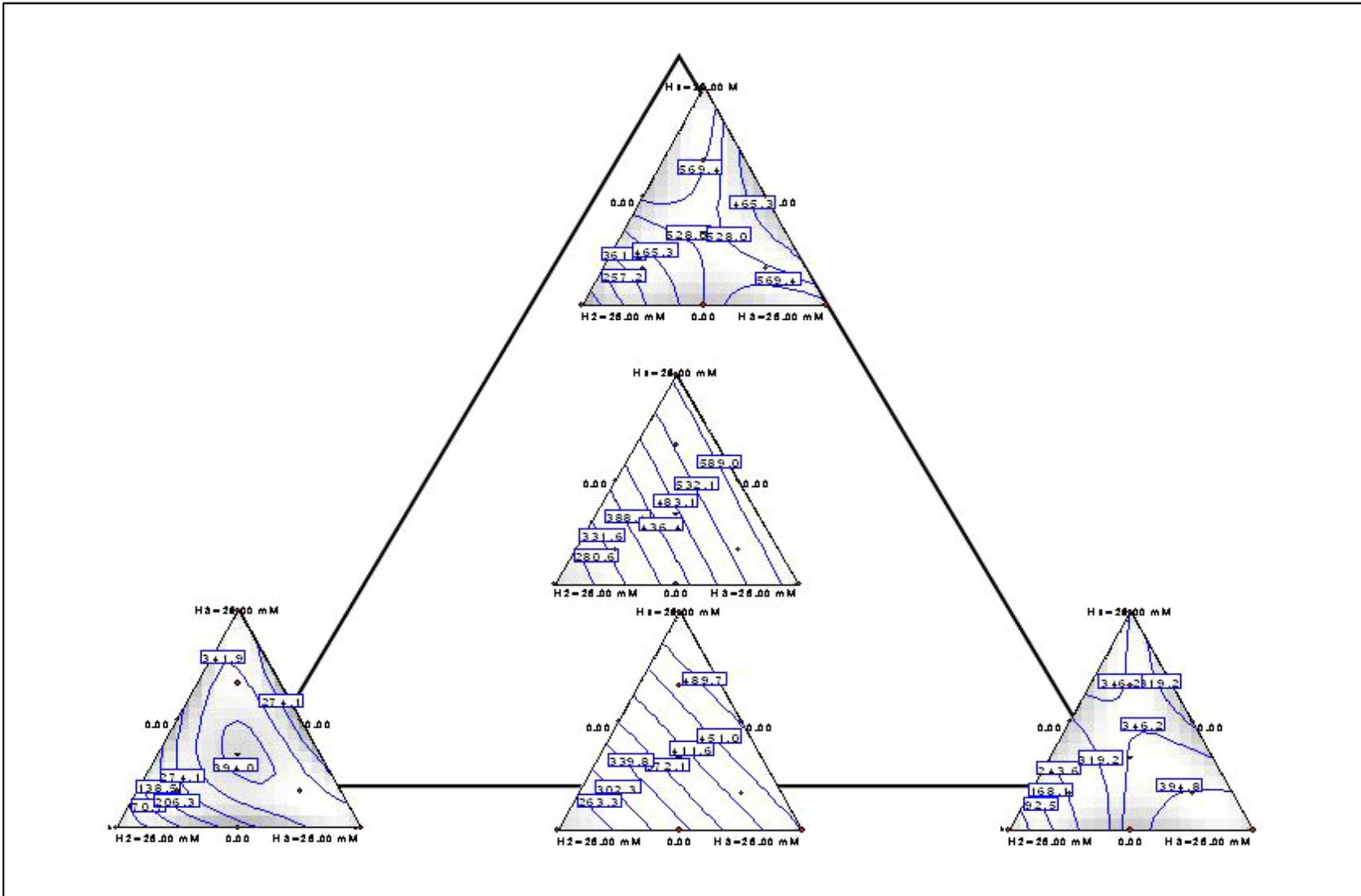


Fig. 58: Gráficos de contorno de las superficies obtenidas para la respuesta q_{lac} en cada punto del diseño S2, dependientes de la combinación de hexosax.

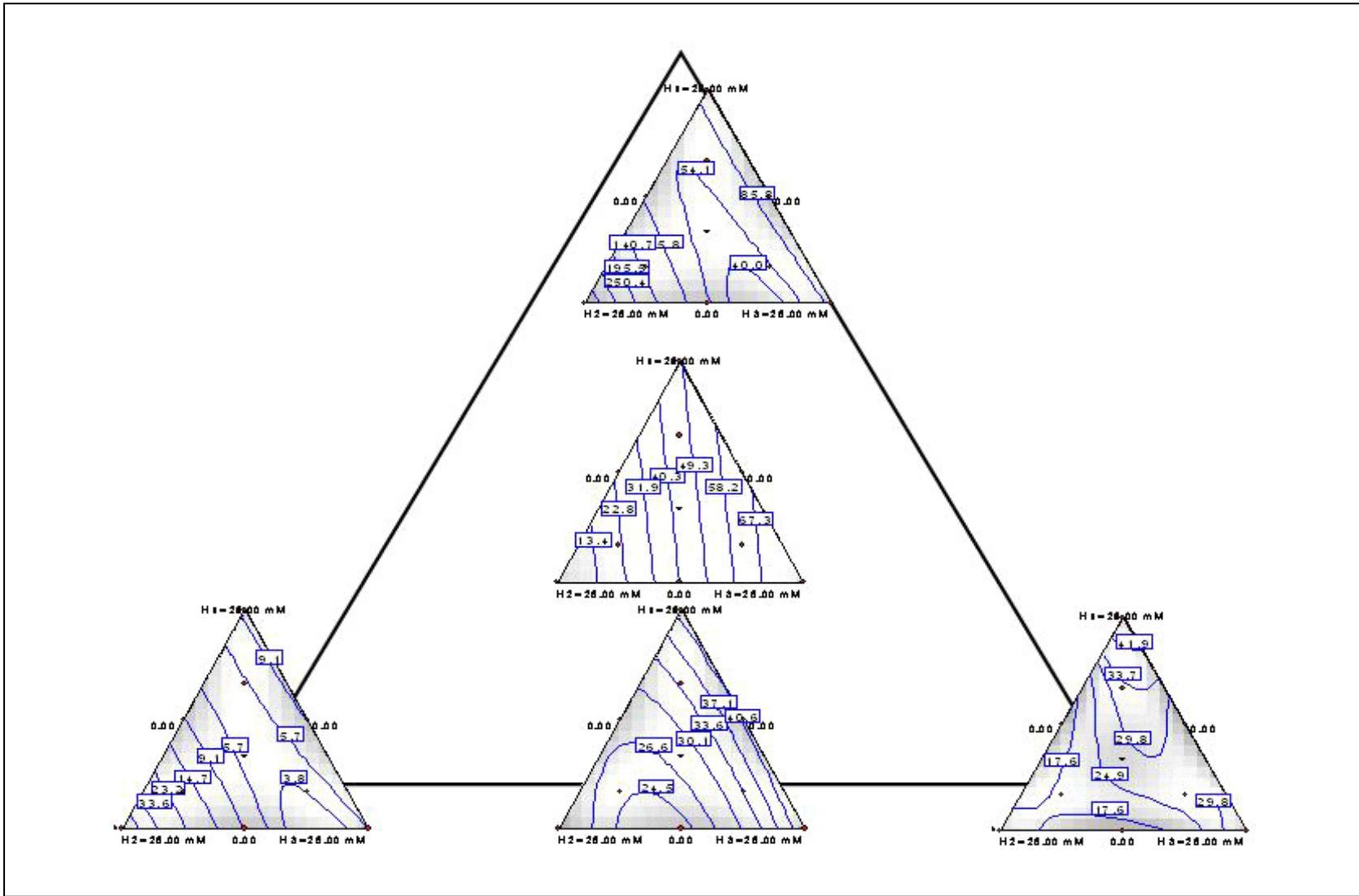


Fig. 59: Gráficos de contorno de las superficies obtenidas para la respuesta q_{ams} en cada punto del diseño S2, dependientes de la combinación de hexosas.

En la Tabla LXIII se presentan las respuestas consideradas y el objetivo de la optimización a través de la función D . Los límites inferiores indicados para ICV, q_{lac} y q_{am} corresponden a los menores valores empíricos obtenidos para estas respuestas (ver Tabla LXI), mientras que los límites inferiores establecidos para q_{rhEPO} y AB_t coinciden con el mínimo valor experimental que incluye al 70% de los datos (es decir, se excluye el 30% de los datos más bajos). Los límites superiores impuestos corresponden a los valores más altos obtenidos empíricamente. Se asignó un peso $w_i=1$ para todas las respuestas de manera que d_i variase linealmente entre 0 y 1.

Tabla LXIII: Respuestas a ser consideradas en la construcción de las funciones d_i .

Respuesta	Unidades	Objetivo	Límites		w_i	r_i
			Inferior	Superior		
ICV	cél. h ml ⁻¹	maximizar	$3,07 \times 10^6$	$1,33 \times 10^8$	1	5
q_{rhEPO}	% cél. ⁻¹ h ⁻¹	maximizar	$4,50 \times 10^{-7}$	$1,47 \times 10^{-6}$	1	5
AB_t	UI mg ⁻¹	maximizar	40.000	73.000	1	5
q_{lac}	nmol 10 ⁻⁶ cél. ⁻¹ h ⁻¹	minimizar	0	719	1	1
q_{am}	nmol 10 ⁻⁶ cél. ⁻¹ h ⁻¹	minimizar	5,8	388	1	1

Se construyeron así las funciones d_i para cada respuesta en cada punto del diseño S2, de acuerdo con las Ec. (46) a (50). En estas expresiones y representa la respuesta empírica obtenida.

a) Función d_i para la respuesta ICV (d_{ICV}):

$$d_{ICV} = \begin{cases} d_{ICV} = \frac{y - 3,07 \times 10^6}{1,329 \times 10^7 - 3,07 \times 10^6} & 3,07 \times 10^6 \leq y \leq 1,329 \times 10^7 \\ d_{ICV} = 1 & y > 1,329 \times 10^7 \\ d_{ICV} = 0 & y < 3,07 \times 10^6 \end{cases} \quad (46)$$

b) Función d_i para la respuesta q_{lac} (d_{qlac}):

$$d_{q_{iac}} = \begin{cases} d_{q_{iac}} = 1 - \frac{y}{719} & 0 \leq y \leq 719 \\ d_{q_{iac}} = 1 & y < 0 \\ d_{q_{iac}} = 0 & y > 719 \end{cases} \quad (47)$$

c) Función d_i para la respuesta q_{am} ($d_{q_{am}}$):

$$d_{q_{am}} = \begin{cases} d_{q_{am}} = \frac{388 - y}{388 - 5,8} & 5,8 \leq y \leq 388 \\ d_{q_{am}} = 1 & y < 5,8 \\ d_{q_{am}} = 0 & y > 388 \end{cases} \quad (48)$$

d) Función d_i para la respuesta q_{rhEPO} ($d_{q_{rhEPO}}$):

$$d_{q_{rhEPO}} = \begin{cases} d_{q_{rhEPO}} = \frac{y - 4,5 \times 10^{-7}}{1,473 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-7}} & 4,5 \times 10^{-7} \leq y \leq 1,473 \times 10^{-6} \\ d_{q_{rhEPO}} = 1 & y > 1,473 \times 10^{-6} \\ d_{q_{rhEPO}} = 0 & y < 4,5 \times 10^{-7} \end{cases} \quad (49)$$

e) Función d_i para la respuesta AB_t (d_{AB_t}):

$$d_{AB_t} = \begin{cases} d_{AB_t} = \frac{y - 40.000}{73.000 - 40.000} & 40.000 \leq y \leq 73.000 \\ d_{AB_t} = 1 & y > 73.000 \\ d_{AB_t} = 0 & y < 40.000 \end{cases} \quad (50)$$

Posteriormente se calculó la función deseabilidad global D de acuerdo con la Ec. (45). A aquellas respuestas que debían ser maximizadas y que fueron consideradas críticas: crecimiento (ICV), productividad (q_{rhEPO}) y calidad glicosídica (AB_t) - se les asignó una importancia relativa máxima ($r_i=5$), mientras que aquellas asociadas a la producción de catabolitos y que debían ser minimizadas, se consideró una $r_i=1$ (Tabla LXIII). En la Fig. 60 se muestran los gráficos de contorno correspondientes a la función D obtenidas para cada mezcla de glutamina, glutamato y asparagina ensayada.

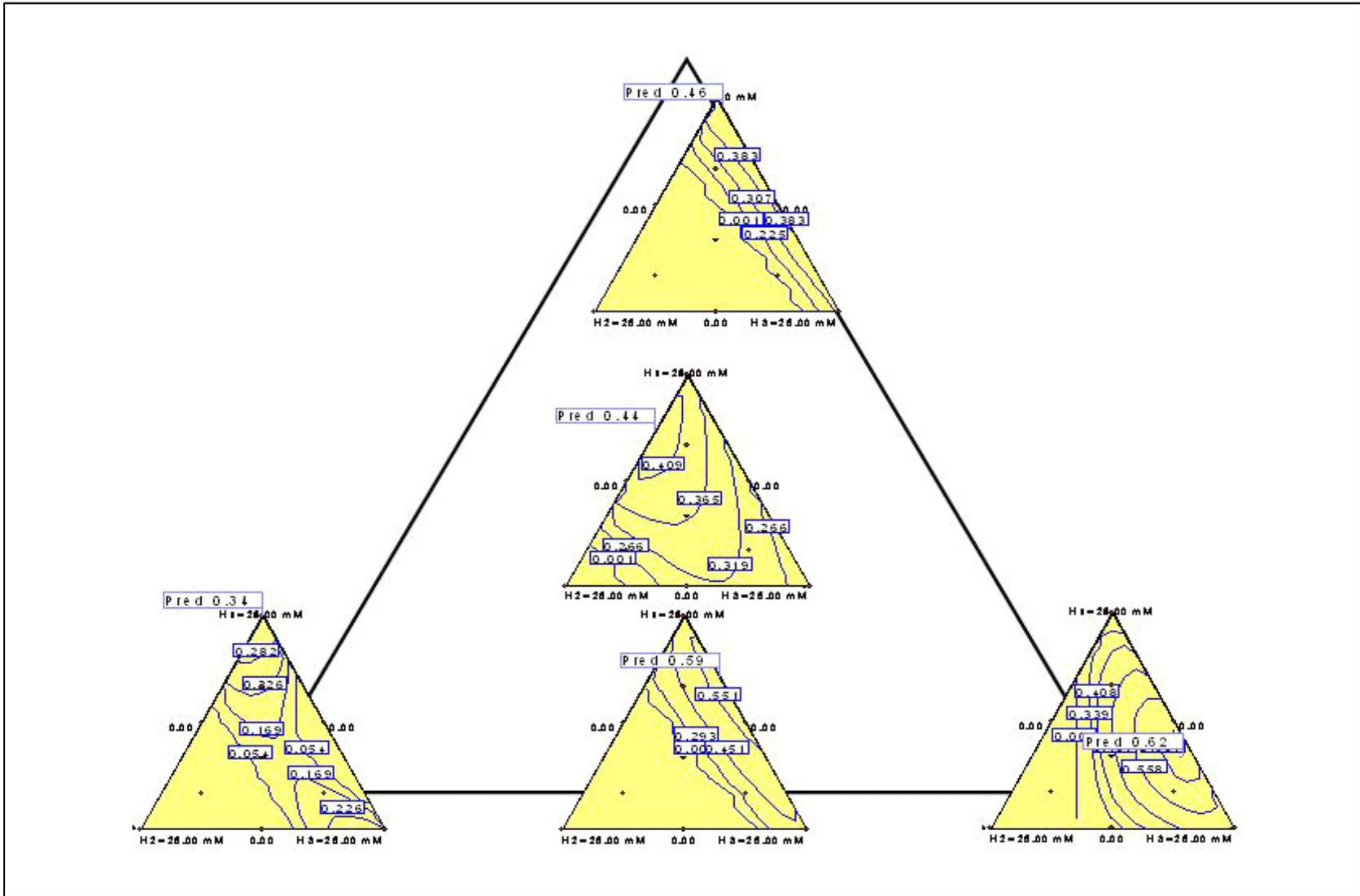


Fig. 60: Gráficos de contorno de las superficies obtenidas para la función D en cada punto del diseño S2, dependientes de la combinación de hexosax.

Según se observa en estos gráficos, los valores máximos predichos para la función D oscilan entre 0,339 (medio Zell-C5) y 0,618 (medio Zell-C4). Estos valores se presentan en la Tabla LXIV, en donde se incluye, además, el valor relativo porcentual de D y la combinación óptima de glucosa, galactosa y manosa correspondiente a cada uno de ellos.

Tabla LXIV: Valores máximos predichos para la función D y combinaciones óptimas de hexosas para las que corresponden dichos valores.

Punto experimental	Valor D máximo predicho	Valor D relativo (%)	Combinación óptima de hexosas (mM)		
S2-a	0,618	100	H1= 8,29	H2=1,22	H3=15,49
S2-b	0,339	54,8	H1=25,00	H2=0,00	H3= 0,00
S2-c	0,462	74,8	H1=23,91	H2=0,00	H3= 1,09
S2-d	0,439	71,0	H1=18,34	H2=6,66	H3= 0,00
S2-e	0,587	94,9	H1=17,84	H2=0,00	H3= 7,16

Resulta interesante observar que los valores más altos predichos para D se obtienen en aquellos medios de cultivo sin glutamina: en el medio Zell-C4 (correspondiente al punto experimental S2-a) se adicionó exclusivamente asparagina, en tanto se utilizó una mezcla de partes iguales de asparagina y glutamato en el medio denominado Zell-C8 (punto S2-e).

Si bien el glutamato no es en sí mismo una fuente de energía apropiada para sostener el crecimiento celular, independientemente de la mezcla de hexosas analizada, se obtuvieron isoformas de alta actividad biológica en los casos en los que se utilizó una mezcla pura de este aminoácido. El valor de importancia i asignada a esta respuesta sería entonces la razón del alto valor de D obtenido para la mezcla 1:1 de asparagina y glutamato.

Los valores de D obtenidos al realizar el modelado de los datos se consideran muy satisfactorios, especialmente debido al alto número de respuestas a optimizar en forma simultánea. Por esta misma razón se considera que $D=0,62$ y $D=0,59$ son igualmente buenos, y en consecuencia ambas mezclas de compuestos permitirían obtener resultados óptimos. Los medios de cultivo así obtenidos se denominaron Zell-C9 y Zell-C10 (Tabla LXV).

Tabla LXV: Medios de cultivo optimizados siguiendo diferentes metodologías de análisis, para la producción de rhEPO en cultivo por lote.

Medio	Glc (mM)	Gal (mM)	Man (mM)	Gln (mM)	Glu (mM)	Asn (mM)
Zell-C9	8,29	1,22	15,49	0,00	0,00	5,1
Zell-C10	17,84	0,00	7,16	0,00	2,55	2,55

Si bien a través del análisis simple llevado a cabo fue posible predecir la combinación de hexosas que optimizaría los resultados esperados para una dada mezcla experimental de glutamina, glutamato y asparagina, no fue suficiente para definir la mezcla óptima de estos tres aminoácidos. Se procedió entonces a realizar el *análisis integral* de los datos experimentales a través del *producto de modelos*.

6.4.6. Estudio de las respuestas: análisis integral

El *software Design Expert®* v.6.0.10 permite analizar la interacción entre los componentes de una mezcla y un conjunto de variables de proceso (como por ejemplo temperatura y presión del sistema), pero no la interacción entre dos mezclas, como es el caso de este trabajo. Debido a esto, el ajuste del modelo para cada respuesta fue obtenido mediante el cálculo de los coeficientes del producto de modelos, como se describe a continuación:

Cada respuesta y depende del producto de dos funciones, $f(x)$ y $g(z)$ [Ec. (40)]. Para las cinco respuestas evaluadas (ICV, q_{rhEPO} , q_{lac} , q_{am} , AB_t), $f(x)$ y $g(z)$ son modelos cuadráticos de la forma mostrada en la Ec. (38).

Para realizar el producto de modelos, definimos en primer lugar a la función $f(x)$, la cual describe la dependencia de la respuesta y con respecto a las variables glucosa (x_1), galactosa (x_2) y manosa (x_3):

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (51)$$

Los parámetros b_i de esta ecuación dependen de los niveles de glutamina (z_1), glutamato (z_2) y asparagina (z_3). Así,

$$b_1 = \beta_{1,1}z_1 + \beta_{1,2}z_2 + \beta_{1,3}z_3 + \beta_{1,12}z_1z_2 + \beta_{1,13}z_1z_3 + \beta_{1,23}z_2z_3 \quad (52)$$

$$b_2 = \beta_{2,1}z_1 + \beta_{2,2}z_2 + \beta_{2,3}z_3 + \beta_{2,12}z_1z_2 + \beta_{2,13}z_1z_3 + \beta_{2,23}z_2z_3 \quad (53)$$

$$b_3 = \beta_{3,1}z_1 + \beta_{3,2}z_2 + \beta_{3,3}z_3 + \beta_{3,12}z_1z_2 + \beta_{3,13}z_1z_3 + \beta_{3,23}z_2z_3 \quad (54)$$

$$b_{12} = \beta_{12,1}z_1 + \beta_{12,2}z_2 + \beta_{12,3}z_3 + \beta_{12,12}z_1z_2 + \beta_{12,13}z_1z_3 + \beta_{12,23}z_2z_3 \quad (55)$$

$$b_{13} = \beta_{13,1}z_1 + \beta_{13,2}z_2 + \beta_{13,3}z_3 + \beta_{13,12}z_1z_2 + \beta_{13,13}z_1z_3 + \beta_{13,23}z_2z_3 \quad (56)$$

$$b_{23} = \beta_{23,1}z_1 + \beta_{23,2}z_2 + \beta_{23,3}z_3 + \beta_{23,12}z_1z_2 + \beta_{23,13}z_1z_3 + \beta_{23,23}z_2z_3 \quad (57)$$

Sustituyendo las Ec. (52) a (57) en la Ec. (51) se tiene que:

$$\begin{aligned} y = & (\beta_{1,1}z_1 + \beta_{1,2}z_2 + \beta_{1,3}z_3 + \beta_{1,12}z_1z_2 + \beta_{1,13}z_1z_3 + \beta_{1,23}z_2z_3)x_1 + \\ & + (\beta_{2,1}z_1 + \beta_{2,2}z_2 + \beta_{2,3}z_3 + \beta_{2,12}z_1z_2 + \beta_{2,13}z_1z_3 + \beta_{2,23}z_2z_3)x_2 + \\ & + (\beta_{3,1}z_1 + \beta_{3,2}z_2 + \beta_{3,3}z_3 + \beta_{3,12}z_1z_2 + \beta_{3,13}z_1z_3 + \beta_{3,23}z_2z_3)x_3 + \\ & + (\beta_{12,1}z_1 + \beta_{12,2}z_2 + \beta_{12,3}z_3 + \beta_{12,12}z_1z_2 + \beta_{12,13}z_1z_3 + \beta_{12,23}z_2z_3)x_1x_2 + \\ & + (\beta_{13,1}z_1 + \beta_{13,2}z_2 + \beta_{13,3}z_3 + \beta_{13,12}z_1z_2 + \beta_{13,13}z_1z_3 + \beta_{13,23}z_2z_3)x_1x_3 + \\ & + (\beta_{23,1}z_1 + \beta_{23,2}z_2 + \beta_{23,3}z_3 + \beta_{23,12}z_1z_2 + \beta_{23,13}z_1z_3 + \beta_{23,23}z_2z_3)x_2x_3 \end{aligned} \quad (58)$$

Tenemos entonces 36 coeficientes β que deben ser determinados para definir la función dependiente en x y en z que dará origen a la superficie de respuesta de y . Ya que se realizaron 10 experimentos independientes entre sí (las 10 mezclas de hexosas, sin considerar los replicados) en 5 ocasiones (5 mezclas de aminoácidos evaluadas) se tiene - idealmente - un sistema de $10 \times 5 = 50$ ecuaciones independientes, a partir de las cuales se calcularon los 36 coeficientes de la Ec. (58).

Si bien es posible el ajuste de las funciones $f(x)$ y $g(z)$ a modelos cúbicos especiales [Ec. (39)], la Ec. (58) hubiera requerido la determinación de 49 coeficientes β , correspondientes a los términos:

$$\begin{array}{lll}
 x_1 z_1 z_2 z_3 & x_2 z_1 z_2 z_3 & x_3 z_1 z_2 z_3 \\
 x_1 x_2 z_1 z_2 z_3 & x_1 x_3 z_1 z_2 z_3 & x_2 x_3 z_1 z_2 z_3 \\
 x_1 x_2 x_3 z_1 & x_1 x_2 x_3 z_2 & x_1 x_2 x_3 z_3 \\
 x_1 x_2 x_3 z_1 z_2 & x_1 x_2 x_3 z_1 z_3 & x_1 x_2 x_3 z_2 z_3 \\
 x_1 x_2 x_3 z_1 z_2 z_3 & &
 \end{array}$$

Los excelentes parámetros de ajuste obtenidos para el producto de modelos cuadráticos – como se muestra más adelante –, sumado a la ausencia de algunos datos experimentales que hubiera complicado este último enfoque, fueron las razones por las que se decidió ajustar las respuestas a un producto de esos modelos.

El procedimiento seguido para el estudio de las respuestas fue análogo al descrito anteriormente para el caso del análisis simple. Una vez obtenidos los coeficientes β se construyeron las superficies definidas por las nuevas funciones $y = f(x) \times g(z)$ al realizar el producto de modelos para cada respuesta, obteniéndose los parámetros de ajuste que se presentan en la Tabla LXVI. Como puede observarse, todos los modelos resultantes fueron significativos, ya que el valor P asociado al modelo fue menor a 0,05 en todos los casos, en tanto la prueba de falta de ajuste fue significativa para las respuestas q_{rhEPO} y q_{am} . El valor denominado R^2 ajustado es una variación de la expresión del coeficiente de determinación R^2 , y tiene la ventaja sobre éste de que la adición de términos no significativos al modelo hace que disminuya su valor, lo que permite anular estos términos y simplificar el modelo ajustado (Myers y Montgomery, 1995).

Tabla LXVI: Valores F y P del producto de modelos cuadráticos, valor R^2 ajustado para este producto y valor P de la prueba de falta de ajuste.

Respuesta	Producto de modelos	Valor F (modelo)	Valor P (modelo)	R^2 Ajustado	Valor P (LOF)
ICV	Cuadrático × Cuadrático	6,460	<0,0001	0,722	0,307
q_{rhEPO}	Cuadrático × Cuadrático	8,392	<0,0001	0,781	0,013
AB_t	Cuadrático × Cuadrático	11,043	<0,0001	0,832	0,052
q_{lac}	Cuadrático × Cuadrático	5,458	<0,0001	0,679	0,233
q_{am}	Cuadrático × Cuadrático	2,854	0,0055	0,500	0,005

A partir de los ajustes realizados se calcularon las funciones d_i , en idénticas

condiciones a las indicadas en el primer análisis. Una vez obtenidas estas funciones parciales, se construyó una nueva función deseabilidad global D . En esta ocasión, el máximo obtenido para la función fue de 0,61 y corresponde a un medio de cultivo (denominado Zell-C11) con la siguiente composición:

Tabla LXVII: Composición del medio Zell-C11 obtenido mediante el análisis integral de las respuestas.

Compuesto	Concentración (mM)
Glucosa	13,84
Galactosa	0,37
Manosa	10,79
Glutamina	0,10
Glutamato	2,13
Asparagina	2,87

La superficie obtenida para la función D en función de la mezcla de hexosas, para la combinación óptima predicha de aminoácidos glutamina= 0,1 mM, glutamato= 2,13 mM, asparagina= 2,87 mM se muestra en la Fig. 61.

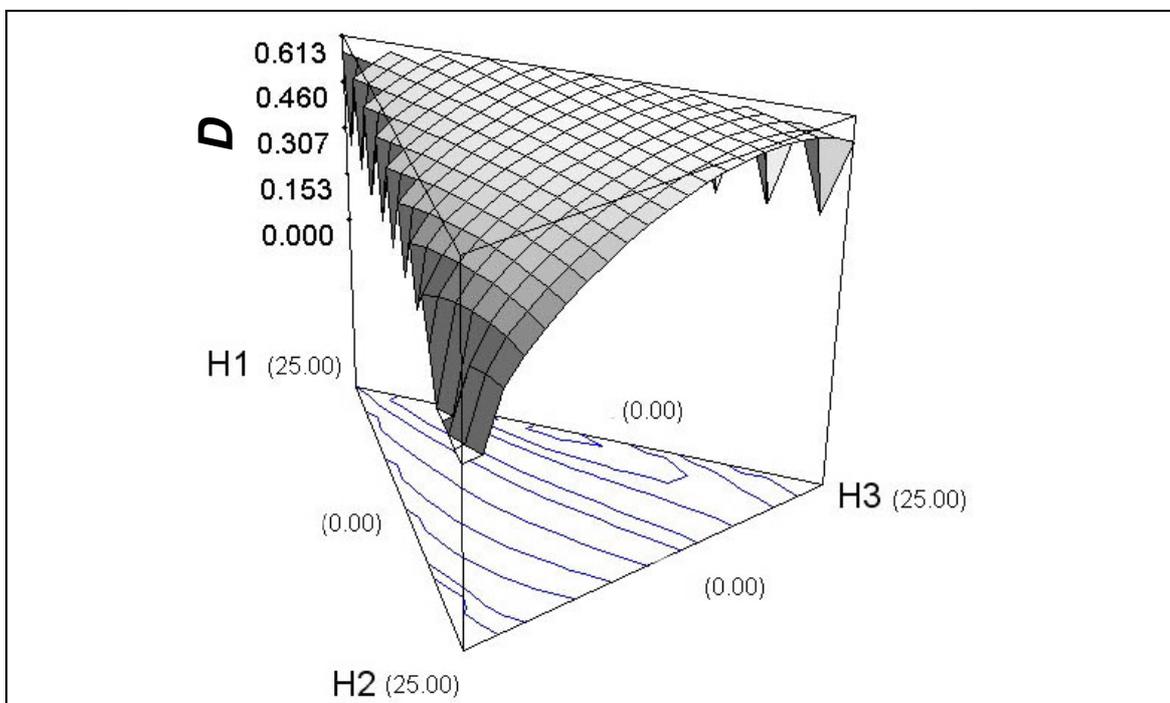


Fig. 61: Superficie obtenida para la función deseabilidad global D dependiente de la mezcla de hexosas, para la combinación óptima de aminoácidos predicha (glutamina= 0,1 mM, glutamato= 2,13 mM, asparagina= 2,87 mM).

Es importante destacar que la mezcla optimizada de los seis componentes en estudio se encuentra en una región del espacio experimental muy cercana a los óptimos predichos anteriormente por el análisis simple de las respuestas. En particular, del punto glucosa= 17,84 mM, galactosa= 0 mM, manosa= 7,16 mM, glutamina= 0 mM, glutamato= 2,55 mM, asparagina= 2,55 mM para el cual se había predicho un valor de $D=0,59$.

La nueva versión del *software Design Expert® v.7.0*, liberada al mercado luego de la conclusión del trabajo experimental de esta tesis, incluye el estudio de la interacción entre mezclas, con el nombre de *mixture x mixture analysis*.

6.5. CONCLUSIONES

- Los medios de cultivo que contienen exclusivamente galactosa no permitieron el desarrollo del clon B1A2, independientemente de la mezcla de aminoácidos usada.
- Igual efecto se observó cuando se utilizó una mezcla pura de glutamato: los cultivos no se desarrollaron satisfactoriamente, para ninguna de las mezclas de azúcares evaluadas.
- La mezcla de glutamina, glutamato y asparagina en las concentraciones presentes en el medio Zell-C6 son suficientes para permitir un desarrollo celular aceptable y la obtención de perfiles metabólicos similares, independientemente de la mezcla de hexosas utilizada.
- Los valores más altos de ICV se obtuvieron en los medios de cultivo con mayor contenido de asparagina (Zell-C4 y Zell-C8).
- Se observó una gran variabilidad en los valores de ICV entre los cultivos en medio Zell-C4, indicando que el desarrollo del cultivo es más dependiente de la composición de hexosas cuando sólo se cuenta con asparagina en el medio.
- La velocidad de consumo de glucosa dependió de la concentración de esta especie en el medio, indicando que cuando ésta se encuentra en bajos niveles en el medio las células utilizan otros sustratos metabólicos desde el inicio del cultivo.
- Los valores de q_{lac} , al contrario, fueron muy similares durante las primeras 48 h de cultivo, independientemente de la mezcla de azúcares usada, para cada medio de cultivo. Las diferentes concentraciones finales se deben a la diferente extensión del tiempo de cultivo para el cual se mantuvo constante el valor de q_{lac} .
- Se verificó gran variabilidad en las velocidades específicas de producción de amonio: aún en cultivos sin glutamina se alcanzaron altas concentraciones de este ion.

- A excepción del medio con 100% de glutamato, en los otros casos se verificó siempre una producción de este aminoácido. Los altos niveles de amonio generados indicarían que la síntesis de glutamato no sería una vía utilizada para la detoxificación de este ion.
- El análisis simple de las respuestas modeladas por RSM permitió predecir la combinación de hexosas que optimizaría los resultados esperados para una dada mezcla experimental de glutamina, glutamato y asparagina. Se definieron así los medios Zell-C9 y Zell-C10. El medio Zell-C9 está suplementado con una mezcla de Glc=8,29 mM; Gal=1,22 mM; Man=15,49 mM; Gln=0,0 mM; Glu=0,0 mM; Asn=5,1 mM. El medio Zell-C10 está suplementado con una mezcla de Glc=17,84 mM; Gal=0,0 mM; Man=7,16 mM; Gln=0,0 mM; Glu=2,55 mM; Asn=2,55 mM.
- Los valores de D predichos para Zell-C9 y Zell-C10 (0,62 y 0,59, respectivamente) son altamente significativos, debido a que se optimizaron cinco respuestas simultáneamente.
- El análisis integral de las respuestas, por otro lado, permitió predecir la combinación óptima de los seis factores, obteniéndose así el medio de cultivo Zell-C11 suplementado con Glc=13,84 mM; Gal=0,37 mM; Man=10,79 mM; Gln=0,10 mM; Glu=2,13 mM; Asn=2,87 mM. El valor de D para este medio fue de 0,61.
- El modelado de las respuestas por RSM y la generación de la función D permitieron definir tres medios de cultivo que optimizarían los resultados buscados durante la producción de rhEPO en un proceso por lote. La robustez de este análisis se comprobará en el capítulo siguiente, al compararlo con los resultados obtenidos mediante el análisis de las respuestas a través de la aplicación de redes neuronales artificiales.

7-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

CAPÍTULO 4

7. 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

7.1. OBJETIVOS

Diseñar medios de cultivos definidos mediante la aplicación de redes neuronales artificiales para optimizar el patrón de glicofomas de rhEPO producidas por el clon B1A2, cuando éste es cultivado en suspensión utilizando sistemas de cultivo en modo *batch* y en modo continuo con perfusión.

7.2. INTRODUCCIÓN

Las redes neuronales artificiales (*Artificial Neural Networks*, ANN, Zupan y Gasteiger, 1999) constituyen una de las metodologías de optimización utilizadas – entre otras aplicaciones - para el diseño de medios de cultivo. Las ANN permiten modelar la relación existente entre un determinado conjunto de variables independientes X (cuyos valores constituyen los datos de entrada o *inputs* de la red) y sus respectivos resultados experimentales Y (llamados datos de salida, *outputs*). La ventaja de las ANN es que no requieren el conocimiento de la función matemática que conecta los *inputs* con los *outputs*: una transformación no lineal y un número suficientemente grande de parámetros (denominados *pesos*, como se explica más adelante) permiten que la red modele casi cualquier relación que conecte los datos de entrada y los de salida (Russel y Norvig, 1996; Kröse y van der Smagt, 1996).

El funcionamiento de las ANN es similar al del cerebro humano: un conjunto de neuronas (o unidades de procesamiento) interconectadas entre sí forman una red. Cada neurona de la red recibe simultáneamente diferentes estímulos, los cuales tienen asociados una cierta intensidad (en un proceso análogo a la sinapsis que ocurre en las neuronas cerebrales). Estos estímulos (y su intensidad, o *peso*) se combinan entre sí para generar el estímulo total - también llamado *input neto* - que recibe cada neurona. El *input neto* sufre una transformación dentro de la neurona y origina una señal de salida (*output*), la que a su vez puede convertirse en el estímulo de la neurona adyacente, o ser el resultado final del proceso. Así, en cada una de las neuronas se realiza un cálculo basado en los datos de

entrada que obtiene de las neuronas a las que se conecta, sin que sea necesario un control global de toda la red (Kasabov, 1998).

En una neurona artificial o unidad de procesamiento se realizan básicamente dos cálculos, a través de las llamadas *función de entrada* $f(x_i)$ y *función de activación* (también llamada *de transformación o transferencia*) g (Kröse y van der Smagt, 1996):

Consideremos n variables independientes X , cada una de las cuales es evaluada en m niveles. En primer lugar, se realiza la suma de los datos de ingreso (los estímulos, $x_{i,j}$) multiplicados por su peso (intensidad del estímulo, $w_{i,j}$), como se muestra en la Ec. (59).

$$f(x_{i,j}) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m w_{i,j} x_{i,j} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, K, n \\ j = 1, 2, K, m \end{array} \quad (59)$$

Al resultado obtenido (*input* neto) se le aplica la función g , no lineal:

$$g(f(x_i)) = g\left(\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m w_{i,j} x_{i,j}\right) \quad (60)$$

Utilizando diferentes funciones de activación g se obtienen resultados diferentes para el mismo conjunto de datos de entrada. Estos resultados se convierten en los estímulos de la neurona vecina, repitiéndose el proceso descrito anteriormente (en general, todas las unidades de procesamiento utilizan la misma función de transferencia, Kasabov, 1998). Las funciones de activación más utilizadas son la función *escalón*, la función *signo* y la función *sigmoidea* (Goicoechea y Olivieri, 2007). La función *escalón* tiene un límite t , de manera que cuando $f(x_i) \geq t$ entonces $g(f(x_i)) = 1$; en caso contrario $g(f(x_i)) = 0$. La función *signo* es similar a la *escalón*, variando entre $[-1; +1]$ en lugar de variar entre $[0; +1]$. La función *sigmoidea*, por otro lado, responde a la ecuación $g(f(x_i)) = \frac{1}{(1 + e^{-f(x_i)})}$. La organización de una unidad de procesamiento se muestra en la Fig. 62.

Las neuronas artificiales se organizan en capas, las cuales están constituidas por una o más neuronas. La llamada *capa de datos de entrada* (*input layer*) está constituida por los valores de las n variables, y se encuentra conectada a una capa intermedia de neuronas

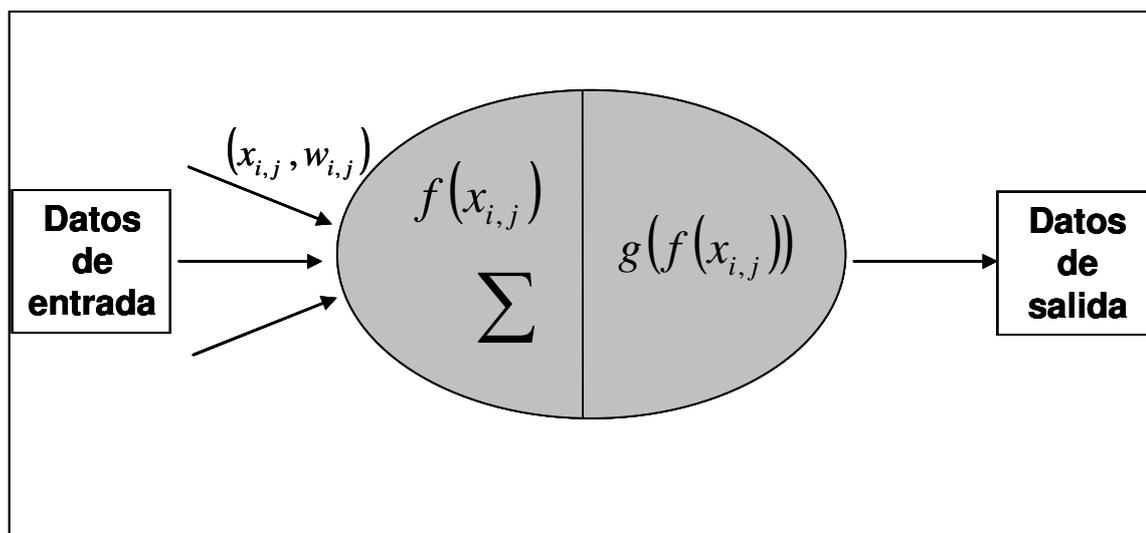


Fig. 62: Organización de una unidad de procesamiento o *neurona*.

artificiales. Esta capa intermedia puede estar conectada a otra capa intermedia, y ésta a su vez a otra, y así sucesivamente. Las capas intermedias se denominan *capas escondidas* (*hidden layers*). En general, las ANN tienen sólo una capa intermedia, ya que no se ha encontrado que un número mayor de capas mejore los resultados obtenidos (Despaigne y Massart, 1998). Las neuronas de la última capa intermedia se encuentran conectadas a una *capa de neuronas de salida* (*output layer*), generalmente constituida por una única neurona de salida, en el caso de que se modele solamente una respuesta. En la Fig. 63 se presenta el esquema de una red de neuronas artificiales con una única capa intermedia.

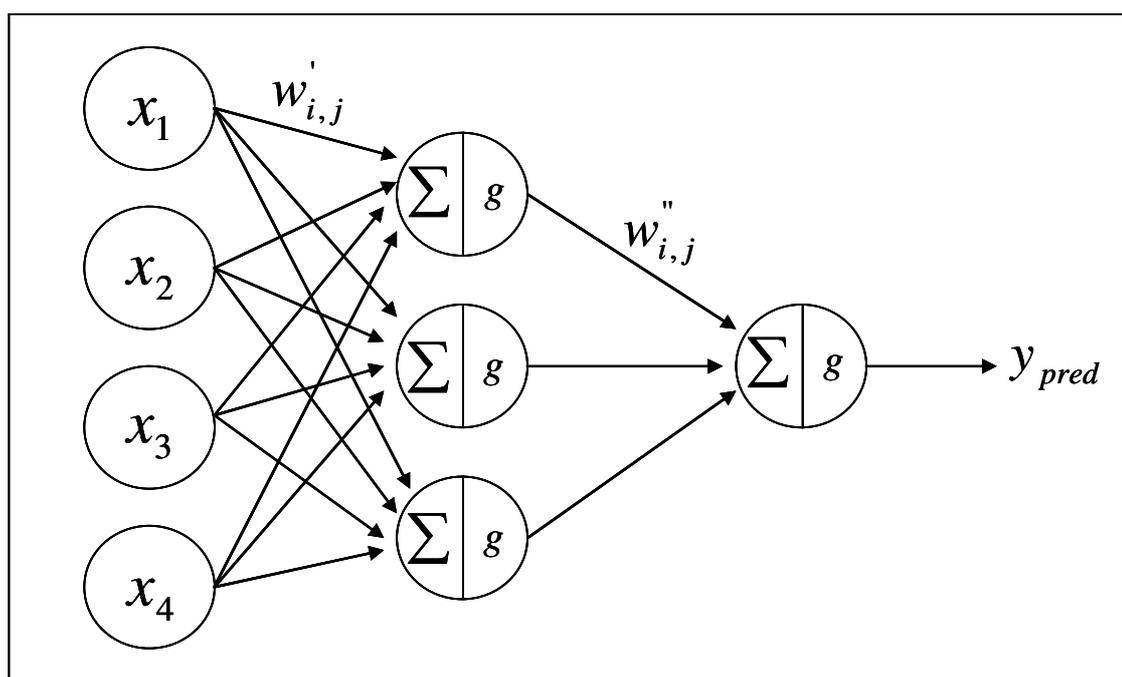


Fig. 63: Esquema de una red de neuronas artificiales con una única capa intermedia.

Al utilizar una ANN es necesario:

- Definir la arquitectura de la red.
- Asignar aleatoriamente los pesos iniciales.
- Definir la constante de velocidad de aprendizaje η , la constante de momento M y la constante del bias θ .

Se denomina *arquitectura* de la red al número de neuronas que se encuentra en cada capa, la cantidad de capas que la componen y la conexión entre las neuronas de cada capa. La arquitectura se representa mediante números que indican la cantidad de neuronas que tiene cada capa: por ejemplo, la arquitectura de la red presentada en la Fig. 63 es 4-3-1.

La arquitectura de la red es el factor principal que influencia la flexibilidad del modelo que se genera. Inicialmente, la arquitectura se define al azar y puede ser modificada durante el proceso en base a los resultados que se van obteniendo. Si la red elegida es demasiado pequeña, el modelo podrá no ser suficiente para establecer la relación entre los datos de ingreso y los de salida. Si por el contrario la red es demasiado grande (y por lo tanto, más compleja), su capacidad de generalizar (es decir, predecir nuevos resultados frente a *inputs* diferentes) se verá disminuida, lo que se denomina *sobreajuste de la red*.

El número de neuronas en cada capa así como el número de capas dependen del uso que se le dará a la red, y es establecido mediante prueba y error. En la mayoría de los casos dos capas activas (una capa escondida y una capa de salida) son suficientes (Russel y Norvig, 1996). Se prefiere también que el número de neuronas en la capa escondida sea lo más pequeño posible para evitar el sobreajuste de la red.

Aunque la red es considerada una herramienta no paramétrica, los modelos están definidos por un conjunto de parámetros ajustables, determinados por un algoritmo. Estos parámetros ajustables son el peso w_i y el *bias* θ asignados a cada dato de ingreso. Como se indicó anteriormente, se asigna un peso numérico a cada dato de entrada - inicialmente en forma aleatoria -, en tanto el *bias* es el umbral de reacción y representa la mínima entrada total ponderada necesaria para provocar la activación de la neurona. Ambos actúan desplazando horizontalmente la función de activación (Goicoechea y Olivieri, 2007).

El procedimiento iterativo que permite determinar estos parámetros se llama *aprendizaje* o *entrenamiento* de la red (*learning* o *training*, en la bibliografía). En primer lugar estos parámetros son elegidos al azar (usualmente es el propio *software* quien realiza esta acción) y se calcula un valor de la respuesta. Luego, en un paso de retroalimentación, el error entre la respuesta real y la predicha es minimizado por ajuste de los parámetros. Cada par de estos pasos es denominado una *época*. El procedimiento se repite hasta la

convergencia, es decir, hasta que se llega a un error previamente especificado o aceptablemente bajo. La capacidad de aprendizaje de una red está determinada por su arquitectura y por el algoritmo de aprendizaje empleado.

Existen diferentes métodos para entrenar una red neuronal:

- *Entrenamiento no supervisado*: en este caso las neuronas de la red deben encontrar una forma de organizarse a sí mismas sin ayuda del exterior. En este tipo de entrenamiento no se proveen resultados esperados contra los cuales la red pueda medir su capacidad predictiva frente a las variables de entrada.
- *Entrenamiento supervisado*: las neuronas reciben del exterior la información de cuán lejos o cerca está la red de resolver el problema.

Entre los métodos de aprendizaje más conocidos se encuentran los siguientes:

- *Método de Hebb*: si una neurona recibe una señal de otra y ambas son (matemáticamente) del mismo signo, el peso de la conexión debe ser incrementado.
- *Método de Hopfield*: es una adaptación del método anterior, define un coeficiente de aprendizaje que se utiliza para definir la magnitud del incremento de la conexión entre las neuronas.
- *Método de Kohonen*: las neuronas compiten por la oportunidad de ajustar sus pesos. Aquella neurona con una salida de mayor magnitud inhibe a las restantes y su respuesta es considerada la señal de salida de la capa a la que pertenece.
- *Método de propagación de errores en sentido reverso*: es el método más utilizado para el entrenamiento de redes, y el que se utilizó en este trabajo.

El *método de propagación de errores en sentido reverso (back-propagation of errors method)* involucra una serie de ecuaciones que son aplicadas a lo largo de la estructura de la red, comenzando con la corrección de los pesos en la última capa (capa de datos de salida) y continuando hacia atrás, “subiendo” hacia la capa de neuronas conectada a la capa de salida y así sucesivamente hasta llegar a la capa de datos de entrada.

La velocidad de corrección de los pesos depende de la constante n : si los pesos varían demasiado rápido, el proceso puede acabar en un mínimo local, mientras que si cambian lentamente el proceso se hace engorroso. Los valores de n generalmente están entre 0,3 y 0,6. El momento M , por otro lado, evita que ocurran cambios rápidos en la dirección en que viene siendo obtenida la solución del problema, ya que tiene en cuenta las correcciones más recientes de los pesos. Un valor de M superior al valor de n elimina oscilaciones, al precio de pasar por alto pequeñas variaciones que podrían llevar a un

cambio en la dirección de la búsqueda de la solución y su mínimo global. En general los valores de n , M y θ son definidos por el *software* usado para el entrenamiento de las redes.

El método de propagación de errores en sentido reverso es un procedimiento de aprendizaje *supervisado*, lo que indica que los pesos son iterativamente corregidos con el fin de obtener valores predefinidos (considerados *correctos*) para la mayor cantidad posible de *inputs*. Para aplicar este método se requieren entonces pares de datos constituidos por un dato de entrada y un dato de salida (valor esperado), los cuales pueden ser datos experimentales. La red así entrenada se constituye entonces en un modelo predictivo para el proceso experimental en estudio.

Las redes neuronales entrenadas mediante este método presentan la ventaja de que no hay necesidad de conocer la forma exacta de la función analítica que conecta los datos de entrada con los datos de salida, ya que se comportan como *cajas negras*. La desventaja asociada es que no es posible asignar una interpretación física a los parámetros que se obtienen de ella.

Al entrenar una red, es importante separar una parte de los datos experimentales (los pares formados por un dato de entrada y su respuesta) para utilizarlos como grupo de monitoreo del entrenamiento de esa red. Las redes neuronales artificiales pueden ser entrenadas hasta un error muy bajo, lo que indica que la red es capaz de describir de manera precisa la relación existente entre los *inputs* y los *outputs* empleados en su proceso de aprendizaje. Sin embargo, esto tiene como consecuencia la pérdida de capacidad de generalizar de la red; es decir, predecir resultados para datos de entrada diferentes a los *inputs* usados - lo que se denominó anteriormente como sobreajuste de la red. Al separar un subconjunto de datos para el monitoreo del aprendizaje de la red, es posible establecer un punto de corte en el proceso de entrenamiento. Ello se logra comparando el error obtenido al predecir las respuestas asociadas a los *inputs* del conjunto de datos de monitoreo con el error del proceso de entrenamiento. Este procedimiento se repite en cada época, hasta determinar los pesos que permiten minimizar los errores de calibración y monitoreo simultáneamente. De lo expresado anteriormente se desprende la importancia de tener un número suficiente de datos experimentales que evite la necesidad de ajustar un gran número de parámetros, lo que conduciría fácilmente a un sobreajuste de la red. Despagne y Massart (1998) sugieren que el número de muestras usadas debería ser superior a 30, aunque pueden obtenerse resultados aceptables con sólo 15 de ellas.

7.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los resultados experimentales obtenidos al realizar el diseño experimental de mezclas cruzadas que se describió en el Capítulo 3 se emplearon en este caso para entrenar redes neuronales artificiales, con el objetivo de predecir las respuestas que se obtendrían al aplicarlas al conjunto de prueba, formado por 800 combinaciones diferentes de los tres azúcares y los tres aminoácidos en estudio.

En primer lugar se definieron las características de medios de cultivo que se deseaba diseñar: un medio para ser utilizado durante la producción de rhEPO en modo por lote, y dos medios de cultivos a ser empleados en el cultivo continuo con perfusión, uno para cada etapa del cultivo.

Se definió una función deseabilidad para cada respuesta, y con ellas se construyó la función D . Las expresiones de d_i y de D se justaron a los requerimientos exigidos a cada medio a ser diseñado.

Se optimizaron así los medios de cultivo denominados Zell-C11, Zell-C12 y Zell-C13, de los cuales se espera que maximicen el crecimiento, la productividad y la calidad glicosídica de la molécula de rhEPO producida por el con B1A2.

7.4. RESULTADOS

7.4.1. Optimización de medios de cultivo

A partir de los resultados experimentales obtenidos al realizar el diseño de mezclas cruzadas, se procedió a entrenar redes neuronales artificiales mediante el método de propagación de errores en sentido reverso con el fin de modelar las respuestas seleccionadas y predecir la combinación de glucosa, galactosa, manosa, glutamina, glutamato y asparagina que maximizase la función deseabilidad global D , para los casos:

7.4.1.1. Cultivo del clon B1A2 en reactor en modo *batch*

El diseño de un medio de cultivo a ser utilizado en la producción de rhEPO en cultivos en modo *batch* se realizó con el objetivo de comparar los resultados obtenidos al aplicar el análisis por RSM y por ANN. El medio de cultivo diseñado se denominó Zell-C12.

7.4.1.2. Cultivo del clon B1A2 en reactor en modo continuo con perfusión

Idealmente, un proceso de producción podría dividirse en dos etapas: la primera

centrada en el crecimiento celular, con el fin de obtener una alta concentración de células, y una segunda fase en la cual las células deberían ser activas, aunque con un crecimiento bajo o inclusive nulo, pero manteniendo su capacidad productiva (Altamirano y col., 2001a).

Siguiendo esta línea de razonamiento, en un proceso de producción en biorreactor con perfusión de medio de cultivo pueden distinguirse entonces dos fases: la primera de ellas transcurre desde que las células son inoculadas en el biorreactor hasta que éstas alcanzan una alta densidad (generalmente, en el rango de $4-8 \times 10^6$ células viables ml^{-1}), en un proceso similar a un cultivo *batch*; es decir, sin que se altere el cultivo en forma externa. En este momento, cuando se alcanza la concentración apropiada de células, se da inicio al proceso de perfusión del cultivo con medio fresco.

Por esta razón se optimizaron dos medios de cultivo para ser utilizados durante la producción de rhEPO en un biorreactor en perfusión, los cuales perseguían objetivos diferentes.

Para la definición del primer medio de cultivo, denominado Zell-C13, se tuvieron en cuenta las condiciones de cultivo que probaron maximizar el crecimiento, ya que la finalidad de este medio era la de llegar rápidamente a una alta concentración de células. Cuando esto ocurriese, se iniciaría el proceso de perfusión con el segundo medio de cultivo, llamado Zell-C14. Este último medio se optimizó teniendo como principal objetivo la mejora de la calidad glicosídica de la molécula producida. Los medios Zell-C13 y Zell-C14 se utilizaron posteriormente para la producción de rhEPO, según se describirá en la Sección 8.

7.4.2. Proceso de análisis de resultados mediante ANN

El proceso de definición de cada medio de cultivo se llevó a cabo a través de las siguientes etapas:

- Definición del *conjunto de calibración* y del *conjunto de monitoreo*.
- Definición del *conjunto de prueba*.
- Definición de las respuestas a ser consideradas.
- Entrenamiento de cinco ANN para cada respuesta en estudio.
- Selección de dos ANN para cada respuesta.
- Predicción de las respuestas para el *conjunto de prueba*.
- Definición y cálculo para cada respuesta de la función deseabilidad parcial.
- Definición y cálculo de la función deseabilidad global.
- Análisis de las combinaciones de los seis factores para las que se obtuvieron los valores más altos de la función *D*.
- Definición del medio de cultivo mejorado.

7.4.2.1. Definición del conjunto de calibración y del conjunto de monitoreo

La Tabla LXVIII muestra las 65 experiencias en las que se evaluaron diferentes mezclas de glucosa, galactosa, manosa, glutamina, glutamato y asparagina, algunas por duplicado. Para el análisis por ANN se tuvieron en cuenta exclusivamente aquellas combinaciones en las que se contaba con todas las respuestas en estudio (por ejemplo, se descartaron los cultivos con 100% de galactosa, en donde no fue posible establecer el perfil de isoformas por IEF). Las mezclas no incluidas en el estudio se indican en letra cursiva.

Finalmente, se separaron aleatoriamente 10 corridas, las cuales constituyeron el denominado *conjunto de monitoreo* (en negrita, en la tabla), y que fueron empleadas para evitar el sobreajuste durante el entrenamiento supervisado de las redes. Las restantes 43 experiencias se usaron para entrenar las ANN (*conjunto de calibración*).

Tabla LXVIII: Combinaciones de los 6 factores utilizadas en el entrenamiento de las ANN. En negrita se indican los experimentos que conforman el conjunto de monitoreo, y en cursiva los experimentos descartados en este análisis.

Experimento Punto S1	Experimento Punto S2	Glucosa (mM)	Galactosa (mM)	Manosa (mM)	Glutamina (mM)	Glutamato (mM)	Asparagina (mM)
S1-a	S2-a	0,00	12,50	12,50	0,00	0,00	5,10
<i>S1-b</i>	<i>S2-a</i>	<i>0,00</i>	<i>25,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>5,10</i>
<i>S1-c</i>	<i>S2-a</i>	<i>12,50</i>	<i>12,50</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>5,10</i>
S1-d	S2-a	4,17	4,17	16,67	0,00	0,00	5,10
S1-e	S2-a	4,17	16,67	4,17	0,00	0,00	5,10
S1-f	S2-a	16,67	4,17	4,17	0,00	0,00	5,10
S1-g	S2-a	8,33	8,33	8,33	0,00	0,00	5,10
S1-h	S2-a	12,50	0,00	12,50	0,00	0,00	5,10
<i>S1-i</i>	<i>S2-a</i>	<i>0,00</i>	<i>25,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>5,10</i>
S1-j	S2-a	0,00	0,00	25,00	0,00	0,00	5,10
S1-k	S2-a	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,10
<i>S1-l</i>	<i>S2-a</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>25,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>5,10</i>
S1-m	S2-a	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,10
S1-a	S2-b	0,00	12,50	12,50	0,00	5,10	0,00
<i>S1-b</i>	<i>S2-b</i>	<i>0,00</i>	<i>25,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>5,10</i>	<i>0,00</i>
S1-c	S2-b	12,50	12,50	0,00	0,00	5,10	0,00
S1-d	S2-b	4,17	4,17	16,67	0,00	5,10	0,00
S1-e	S2-b	4,17	16,67	4,17	0,00	5,10	0,00
S1-f	S2-b	16,67	4,17	4,17	0,00	5,10	0,00
S1-g	S2-b	8,33	8,33	8,33	0,00	5,10	0,00
S1-h	S2-b	12,50	0,00	12,50	0,00	5,10	0,00
<i>S1-i</i>	<i>S2-b</i>	<i>0,00</i>	<i>25,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>5,10</i>	<i>0,00</i>
S1-j	S2-b	0,00	0,00	25,00	0,00	5,10	0,00
S1-k	S2-b	25,00	0,00	0,00	0,00	5,10	0,00
S1-l	S2-b	0,00	0,00	25,00	0,00	5,10	0,00
S1-m	S2-b	25,00	0,00	0,00	0,00	5,10	0,00
S1-a	S2-c	0,00	12,50	12,50	4,00	0,40	0,70
<i>S1-b</i>	<i>S2-c</i>	<i>0,00</i>	<i>25,00</i>	<i>0,00</i>	<i>4,00</i>	<i>0,40</i>	<i>0,70</i>
S1-c	S2-c	12,50	12,50	0,00	4,00	0,40	0,70
S1-d	S2-c	4,17	4,17	16,67	4,00	0,40	0,70
S1-e	S2-c	4,17	16,67	4,17	4,00	0,40	0,70
S1-f	S2-c	16,67	4,17	4,17	4,00	0,40	0,70
S1-g	S2-c	8,33	8,33	8,33	4,00	0,40	0,70
S1-h	S2-c	12,50	0,00	12,50	4,00	0,40	0,70

S1-i	S2-c	0,00	25,00	0,00	4,00	0,40	0,70
S1-j	S2-c	0,00	0,00	25,00	4,00	0,40	0,70
S1-k	S2-c	25,00	0,00	0,00	4,00	0,40	0,70
S1-l	S2-c	0,00	0,00	25,00	4,00	0,40	0,70
S1-m	S2-c	25,00	0,00	0,00	4,00	0,40	0,70
S1-a	S2-d	0,00	12,50	12,50	1,70	1,70	1,70
S1-b	S2-d	0,00	25,00	0,00	1,70	1,70	1,70
S1-c	S2-d	12,50	12,50	0,00	1,70	1,70	1,70
S1-d	S2-d	4,17	4,17	16,67	1,70	1,70	1,70
S1-e	S2-d	4,17	16,67	4,17	1,70	1,70	1,70
S1-f	S2-d	16,67	4,17	4,17	1,70	1,70	1,70
S1-g	S2-d	8,33	8,33	8,33	1,70	1,70	1,70
S1-h	S2-d	12,50	0,00	12,50	1,70	1,70	1,70
S1-i	S2-d	0,00	25,00	0,00	1,70	1,70	1,70
S1-j	S2-d	0,00	0,00	25,00	1,70	1,70	1,70
S1-k	S2-d	25,00	0,00	0,00	1,70	1,70	1,70
S1-l	S2-d	0,00	0,00	25,00	1,70	1,70	1,70
S1-m	S2-d	25,00	0,00	0,00	1,70	1,70	1,70
S1-a	S2-e	0,00	12,50	12,50	0,00	2,55	2,55
S1-b	S2-e	0,00	25,00	0,00	0,00	2,55	2,55
S1-c	S2-e	12,50	12,50	0,00	0,00	2,55	2,55
S1-d	S2-e	4,17	4,17	16,67	0,00	2,55	2,55
S1-e	S2-e	4,17	16,67	4,17	0,00	2,55	2,55
S1-f	S2-e	16,67	4,17	4,17	0,00	2,55	2,55
S1-g	S2-e	8,33	8,33	8,33	0,00	2,55	2,55
S1-h	S2-e	12,50	0,00	12,50	0,00	2,55	2,55
S1-i	S2-e	0,00	25,00	0,00	0,00	2,55	2,55
S1-j	S2-e	0,00	0,00	25,00	0,00	2,55	2,55
S1-k	S2-e	25,00	0,00	0,00	0,00	2,55	2,55
S1-l	S2-e	0,00	0,00	25,00	0,00	2,55	2,55
S1-m	S2-e	25,00	0,00	0,00	0,00	2,55	2,55

7.4.2.2. Definición del conjunto de prueba

Se definieron 800 nuevas combinaciones de los seis componentes, respetando las restricciones impuestas a las mezclas originales. Estas combinaciones exploraron exhaustivamente el espacio experimental en estudio, y fueron obtenidas de la siguiente manera:

En primer lugar, se definieron 25 mezclas de las tres hexosas, cuya composición se representa en el *simplex* de la Fig. 64. A continuación se generaron 32 combinaciones de glutamina, glutamato y asparagina, según se muestra en la Fig. 65. Se realizó entonces la combinación de todas las mezclas posibles, lo que dio origen a las $25 \times 32 = 800$ mezclas de los seis factores, lo que fue denominado el *conjunto de prueba*, usado para la predicción de las respuestas, a partir de los modelos obtenidos para cada ANN. La composición de las mezclas del conjunto de prueba se presenta en el Anexo 3.

7.4.2.3. Definición de las respuestas a ser consideradas

Las respuestas consideradas dentro del análisis, así como las condiciones que aquéllas debían cumplir, se eligieron de acuerdo con los objetivos planteados para cada medio de cultivo en desarrollo.

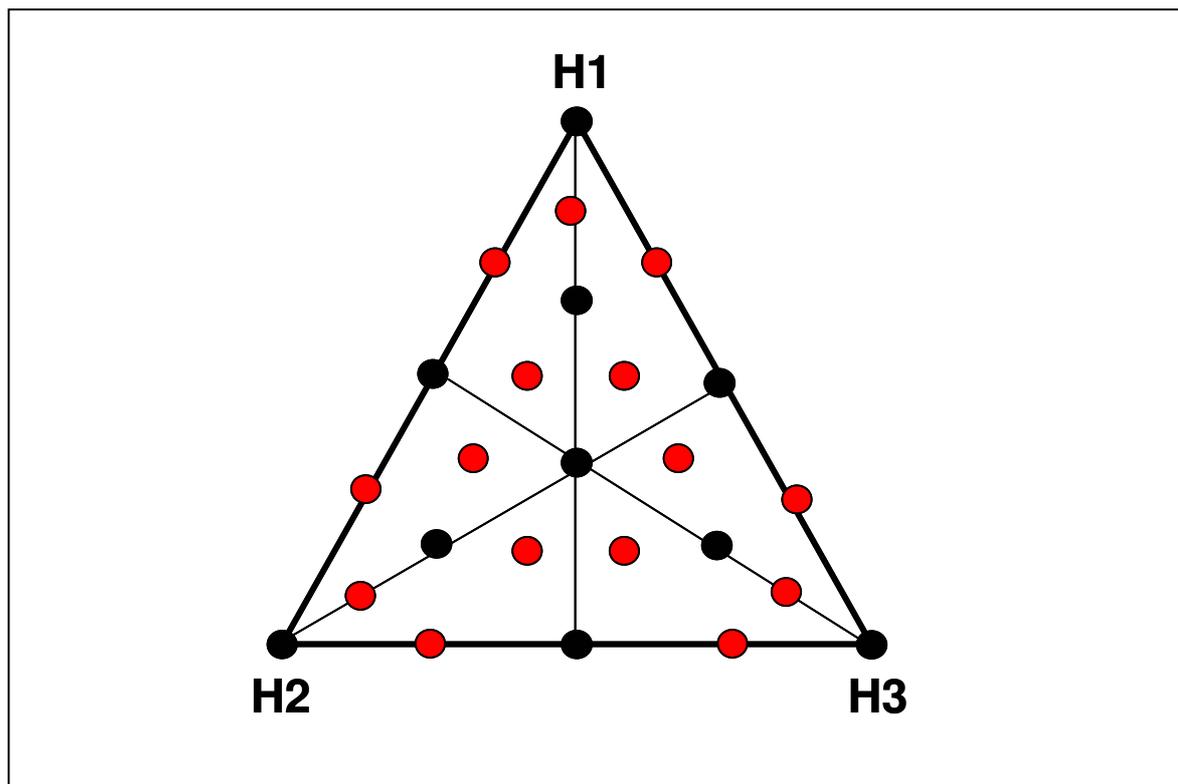


Fig. 64: Diseño *simplex* en donde se indican las 25 mezclas de glucosa, galactosa y manosa utilizadas para generar el conjunto de prueba.

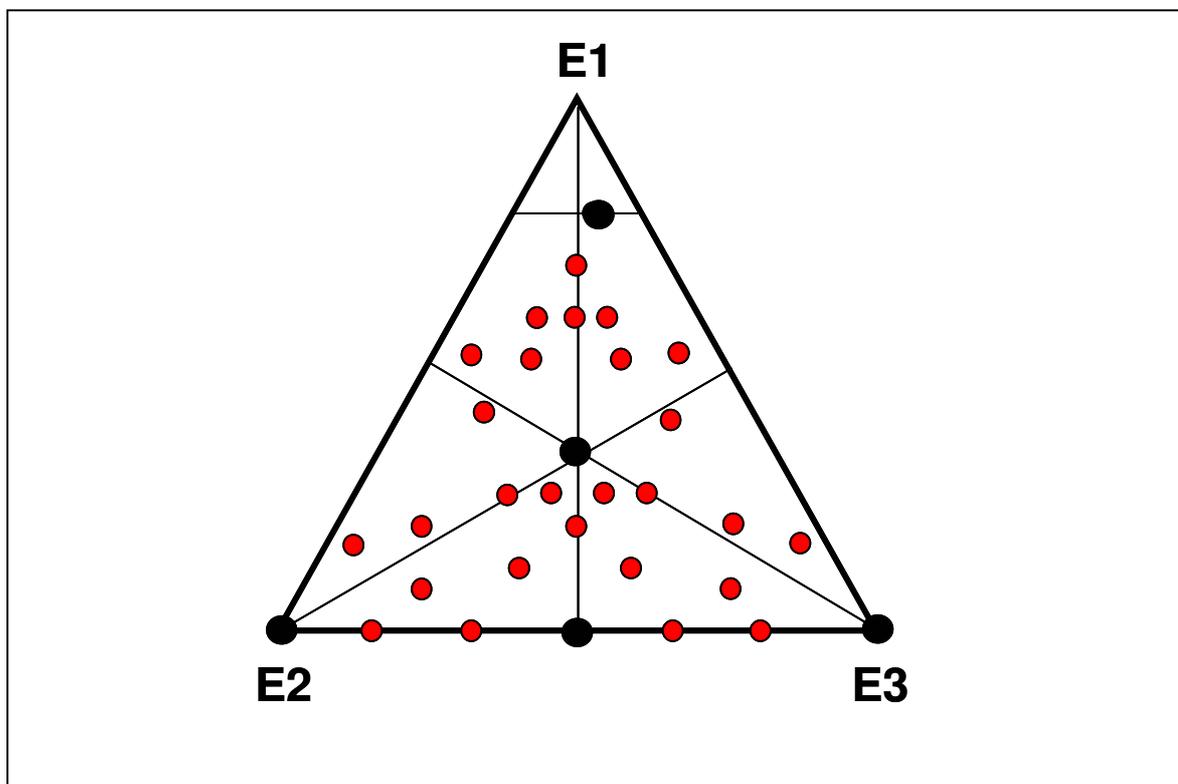


Fig. 65: Diseño *simplex* en donde se indican las 32 mezclas de glutamina, glutamato y asparagina utilizadas para generar el conjunto de prueba.

Medio Zell-C12

Para la definición de este medio de cultivo se tuvieron en cuenta las mismas respuestas analizadas anteriormente cuando se empleó la metodología de superficies de respuesta, es decir, **ICV**, **q_{rhEPO}** , **AB_t** , **q_{lac}** y **q_{am}** .

Medio Zell-C13

Durante la primera etapa del cultivo se busca maximizar el crecimiento, con el fin de alcanzar rápidamente altas densidades celulares y así disminuir el tiempo que transcurre hasta la primera cosecha. Es una etapa similar a un cultivo en modo por lote, en donde se produce el consumo de los nutrientes presentes y la acumulación de catabolitos en el sobrenadante de cultivo. Por esta razón se seleccionaron como respuestas **μ** , **q_{rhEPO}** , **AB_t** , **q_{lac}** y **q_{am}** .

Medio Zell-C14

Durante la segunda etapa del cultivo se pretende que éste sea capaz de mantenerse en el tiempo, aunque ya no se busca un aumento rápido de la masa celular. La velocidad específica de crecimiento debe ser suficiente para permitir la renovación de células en el cultivo, pero sin llevar a un incremento continuo de su concentración. Ello es así porque una concentración demasiado alta induciría la necesidad de retirar parte de la masa celular para evitar el agotamiento rápido de los nutrientes - fundamentalmente el oxígeno -, de baja solubilidad a la temperatura de trabajo.

Deben además seleccionarse las condiciones de cultivo que favorezcan la rápida acumulación de la proteína de interés y, a la vez, que induzcan la síntesis de moléculas altamente glicosiladas.

Por ello, para la definición del medio de cultivo Zell-C14 se consideraron las respuestas **μ** , **q_{rhEPO}** y **AB_t** .

Las respuestas en estudio se codificaron de la siguiente manera: **$\mu=r1$** ; **ICV= $r2$** ; **$q_{lac}=r3$** ; **$q_{am}=r4$** ; **$q_{rhEPO}=r5$** ; **$AB_t=r6$** .

7.4.2.4. Entrenamiento de cinco ANN para cada respuesta en estudio

Cada una de las respuestas seleccionadas fue modelada en forma independiente utilizando cinco redes neuronales diferentes.

El conjunto de algoritmos o *rutina* empleado en la generación de las ANN fue gentilmente cedido por el Dr. Alejandro Olivieri (CONICET-UNR, Rosario, Argentina). Para la mejor red obtenida en cada proceso de aprendizaje se obtuvo la siguiente información:

- **Relación parámetros/datos:** indica la relación entre el número de parámetros ajustados por la red y el número de datos de ingreso utilizados en el entrenamiento.
- **Mejor RMSEC (*Root mean square error of calibration*):** raíz del cuadrado medio del error de calibración, calculado a mediante la siguiente ecuación:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum (r_{nom} - r_{calc})^2}{n}} \quad (61)$$

En la Ec. (61), r_{nom} y r_{calc} son los valores de las respuestas experimentales o *nominales (inputs)* y las respuestas entregadas por la red (o *respuestas calculadas*) luego de cada ciclo (*outputs*) durante el proceso de entrenamiento.

- **Mejor RMSEP (*Root mean square error of prediction*):** raíz del cuadrado medio del error de predicción, calculado con la misma ecuación anterior, pero utilizando las respuestas experimentales y las predichas para el conjunto de monitoreo.
- **Mejor número de épocas:** número de épocas para el cual se obtuvo la mejor relación entre las curvas de RMSEC y RMSEP.
- **Mejor momento *M*:** mejor valor del momento que define el grado de sensibilidad del proceso de entrenamiento para cambiar de dirección.
- **Mejor valor de bias θ :** mejor valor del umbral de reacción del sistema.

La rutina empleada asigna aleatoriamente los pesos iniciales a los factores en estudio, y al final del proceso de aprendizaje muestra (para la mejor red obtenida durante el proceso de aprendizaje) los pesos finales utilizados en la conexión entre cada neurona de ingreso y cada neurona de la capa escondida, así como los pesos que relacionan cada una de estas últimas con la neurona de salida.

La arquitectura de las redes entrenadas consistieron en una capa de datos de ingreso integrada por seis neuronas (una neurona para cada factor en estudio), una única capa escondida formada por un número variable de neuronas, y una capa de datos de salida, con una neurona, para cada respuesta, construyéndose un modelo por respuesta. Esta arquitectura puede representarse como 6/X/1, en donde X es variable.

Inicialmente se siguió el criterio de utilizar un número de neuronas en la capa escondida cercano a seis, que corresponde al número de neuronas en la capa de *inputs*. Un número excesivo de neuronas incrementaría el número de parámetros a ser ajustados, lo que podría originar el sobreajuste de la red que está siendo entrenada; en tanto que un número demasiado pequeño podría no ser suficiente para establecer las relaciones entre los datos de ingreso y la respuesta modelada.

Otro factor que fue modificado para las diferentes redes fue el número de épocas utilizadas para el aprendizaje de la red, aunque en todos los casos fue igual o superior a 5.000. En todos los casos se trabajó con un valor de $n=M=\theta=0,5$.

Cada entrenamiento dio origen a numerosas redes, las cuales difieren en los pesos asignados a las conexiones entre las neuronas de las diferentes capas. Al finalizar el número de épocas deseado (lo que se define con anterioridad al inicio del proceso de aprendizaje), el *software* arroja los datos de la mejor red obtenida; es decir, aquella que mejor modela la respuesta empírica ingresada como dato, minimizando el error en la predicción, y siempre bajo el control de los datos de monitoreo.

Como se indicó anteriormente, se entrenaron al menos cinco ANN para cada respuesta en estudio (en ciertos casos, se entrenaron más redes para una determinada respuesta, presentándose en este trabajo las cinco mejores). En el Anexo 4 se muestra la distribución de los puntos (normalizados) obtenidos al graficar la respuesta predicha por la red versus la respuesta nominal (empírica), para los datos de la forma $(x_1, x_2, x_3, z_1, z_2, z_3)$ usados tanto en la calibración de la red como en el monitoreo del entrenamiento de la misma, para la mejor red obtenida en cada proceso de entrenamiento. Cuanto más se superpongan estos puntos sobre la recta, mejor describe la red la respuesta en estudio. En estas figuras se indica el nombre de la red obtenida de la siguiente manera: al nombre de la respuesta que está siendo modelada (en forma codificada) sigue una letra que representa unívocamente a la red. Por ejemplo, **r3_b** indica que se trata de la red **b** obtenida para la respuesta **r3**; es decir, q_{lac} . Se presentan además los parámetros característicos de la red. El número de datos se refiere al número de datos de ingreso usados para la calibración de la red, que se obtiene al multiplicar las 43 combinaciones de los seis factores por las seis respuestas experimentales obtenidas en cada combinación, lo que da un total de 258 datos.

7.4.2.5. Selección de dos ANN para cada respuesta

A partir de las cinco redes generadas para cada respuesta, se seleccionaron dos de ellas para continuar con el análisis de acuerdo con los siguientes criterios de elección:

- **Arquitectura de la red:** para la misma respuesta se seleccionaron redes de arquitectura diferente.
- **Minimización del error entre los valores predichos por la red y los valores empíricos:** tanto para los datos usados en la calibración como para los usados en el monitoreo de la red, evaluado a través de la relación entre las curvas de RMSEC y RMSEP obtenidas.

En el Anexo 5 se muestra la evolución de RMSEC y RMSEP en función del número de épocas del entrenamiento de las redes seleccionadas, durante el modelado de cada respuesta. El número entre paréntesis corresponde a la época en la que se obtuvo la mejor relación entre RMSEC y RMSEP, y es lo que define a la mejor red obtenida durante ese entrenamiento en particular (estas *mejores redes* son las que se presentaron en las figuras del Anexo 4).

Arbitrariamente se llamó al par de redes neuronales elegidas que modelan una misma respuesta como *ANN 1* y *ANN 2* para la respuesta *i*.

7.4.2.6. Predicción de las respuestas para el conjunto de prueba

Las 12 redes seleccionadas (*ANN 1* y *ANN 2* para cada una de las seis respuestas en estudio) se utilizaron para predecir los resultados que se obtendrían para cada una de las 800 combinaciones de glucosa, galactosa, manosa, glutamina, glutamato y asparagina del conjunto de prueba. Así, se obtuvieron dos resultados para cada respuesta *i*, uno predicho por la *ANN 1* y otro por la *ANN 2*. Estos pares de resultados se indican con los subíndices 1 y 2, respectivamente, luego del nombre de la respuesta.

Por ejemplo, para las mezclas 410 a 420 (cuya composición se detalla en el Anexo 3), se predijeron los resultados que se muestran en la Tabla LXIX.

7.4.2.7. Definición y cálculo para cada respuesta de la función *deseabilidad parcial* d_i

Como se indicó, en cada una de las 800 mezclas del conjunto de prueba se predijeron dos valores (i_1 e i_2) para cada respuesta *i*. A estos resultados predichos se les asignó un valor de d_i variable entre 0 y 1, de acuerdo con los criterios que se indican más abajo. Consecuentemente, se obtuvieron dos valores de d_i (que llamaremos d_{i1} y d_{i2}) para cada respuesta *i* y para cada mezcla.

Tabla LXIX: Respuestas predichas para las mezclas 410 a 420 del conjunto de prueba, utilizando dos redes neuronales artificiales para cada respuesta (ANN 1 y ANN 2). Los resultados están expresados como $[\mu]=h^{-1}$, $[ICV]=cél. h ml^{-1}$, $[q_{rhEPO}]=nmol 10^{-6} cél^{-1} h^{-1}$, $[AB_t]=UI ml^{-1}$, $[q_{lac}]=nmol 10^{-6} cél^{-1} h^{-1}$, $[q_{am}]=nmol 10^{-6} cél^{-1} h^{-1}$.

Mezcla	Respuestas predichas											
	μ_1	μ_2	ICV ₁	ICV ₂	q _{rhEPO1}	q _{rhEPO2}	AB _{t1}	AB _{t2}	q _{lac1}	q _{lac2}	q _{am1}	q _{am2}
410	0,0137	0,0134	1,55E+08	1,45E+08	0,768	1,22	67536	52572	522	542	66	59
411	0,0087	0,0088	7,38E+07	8,08E+07	0,990	1,15	64447	43529	427	416	23	29
412	0,0127	0,0134	1,05E+08	1,01E+08	1,01	1,03	62339	49481	490	503	46	44
413	0,0036	0,0040	1,86E+07	2,35E+07	0,672	0,850	60870	44510	457	441	14	18
414	0,0172	0,0161	1,24E+08	1,18E+08	0,898	0,877	38848	44345	589	600	86	85
415	0,0127	0,0096	7,73E+07	6,09E+07	0,939	0,765	42312	59126	552	577	64	66
416	0,0134	0,0103	8,29E+07	7,21E+07	0,952	0,773	45227	60817	544	568	62	67
417	0,0145	0,0133	1,52E+08	1,48E+08	1,42	1,38	44747	45759	301	344	28	31
418	0,0193	0,0101	2,79E+07	2,72E+07	0,230	0,475	52066	50092	718	659	68	75
419	0,0110	0,0080	9,14E+07	8,18E+07	0,321	0,510	44022	39185	633	594	87	87
420	0,0111	0,0081	9,43E+07	8,38E+07	0,327	0,516	43226	38995	633	588	87	87

Medio Zell-C12:

La función deseabilidad parcial para las respuestas ICV, q_{lac}, q_{am}, q_{rhEPO} y AB_t, se definió de acuerdo con las Ec. (46) a (50) anteriormente utilizadas para el modelado de respuestas mediante RSM.

Medio Zell-C13:

La función d_i para la respuesta μ en el caso del medio de cultivo a ser utilizado durante la primera etapa del cultivo continuo en perfusión (d_μ) se calculó como se presenta en la Ec. (62):

$$d_\mu = \begin{cases} d_\mu = \frac{y - 0,014}{0,020 - 0,014} & 0,014 \leq y \leq 0,020 \\ d_\mu = 1 & y > 0,020 \\ d_\mu = 0 & y < 0,014 \end{cases} \quad (62)$$

Los límites inferior y superior utilizados en el cálculo de d_μ corresponden al rango

de valores experimentales que incluye el 70% de los datos, descartándose los resultados más bajos.

Los valores de d_i calculados para las respuestas, q_{lac} , q_{am} , q_{rhEPO} y AB_t se obtuvieron a partir de las Ec. (47) a (50).

Medio Zell-C14:

El valor de la función d_i calculado para la respuesta μ en el caso del medio de cultivo Zell-C14 (denominado d_{μ^*}) se obtuvo como:

$$d_{\mu^*} = \begin{cases} d_{\mu^*} = 1 & 0,004 \leq y \leq 0,020 \\ d_{\mu^*} = 0 & y < 0,004 \quad ; \quad y > 0,020 \end{cases} \quad (63)$$

Esta definición de d_{μ^*} asigna un valor de 1 a todas las respuestas predichas que se encuentran dentro del rango de valores obtenido experimentalmente para μ , mientras que asume el valor nulo para valores predichos que se encuentren fuera de este intervalo.

Los valores de d_{qrhEPO} y d_{ABt} se obtuvieron de acuerdo con las Ec. (49) y (50).

7.4.2.8. Definición y cálculo de la función *deseabilidad global D*

La expresión de la función D varió de acuerdo con las respuestas consideradas en cada caso; es decir, con los objetivos perseguidos en el diseño de cada uno de los medios de cultivo:

Al igual que cuando se calculó la función D en el análisis por RSM [Ec. (45)], se asignó una importancia relativa $r_i=5$ a la función d_i correspondiente a las respuestas a ser maximizadas, mientras que d_{qlac} y d_{qam} recibieron un valor de $r_i=1$ para el cálculo de la función D .

- **Función deseabilidad global D para el medio Zell-C12**

$$D_{Zell-C12} = \left((d_{ICV})^5 \times (d_{qrhEPO})^5 \times (d_{ABt})^5 \times d_{qlac} \times d_{qam} \right)^{1/7} \quad (64)$$

• **Función deseabilidad global D para el medio Zell-C13**

$$D_{Zell-C13} = \left((d_{\mu})^5 \times (d_{qrhEPO})^5 \times (d_{ABt})^5 \times d_{qlac} \times d_{qam} \right)^{1/7} \quad (65)$$

• **Función deseabilidad global D para el medio Zell-C14**

$$D_{Zell-C14} = \left(d_{\mu^*} \times d_{qrhEPO} \times d_{ABt} \right)^{1/3} \quad (66)$$

Ahora bien, de acuerdo con lo expresado anteriormente, para cada mezcla del conjunto de prueba se obtuvieron entonces los valores d_{ICV1} , d_{ICV2} , $d_{qrhEPO1}$, $d_{qrhEPO2}$, d_{ABt1} , d_{ABt2} , d_{qlac1} , d_{qlac2} , d_{qam1} , d_{qam2} , $d_{\mu1}$ y $d_{\mu2}$ (estos últimos, calculados de manera diferente según el caso). Por esta razón, para el cálculo de los valores de D correspondientes a la optimización de cada medio de cultivo se emplearon todas las combinaciones posibles de d_{i1} y d_{i2} . De esta forma, para cada una de las 800 mezclas del conjunto de prueba se calcularon los $2^5=32$ valores de $D_{Zell-C12}$, los $2^5=32$ valores de $D_{Zell-C13}$ y los $2^3=8$ valores de $D_{Zell-C14}$. Mediante este procedimiento se obtuvieron entonces 25.600 valores de $D_{Zell-C12}$, 25.600 valores de $D_{Zell-C13}$ y 6.400 valores de $D_{Zell-C14}$. La cantidad de valores distintos entre sí dependió fundamentalmente de las expresiones de D [Ec. (64) a (66)].

Por ejemplo, para la mezcla número 98, de composición [Glc=4,17mM, Gal=4,17 mM, Man=16,67 mM, Gln=2,667 mM, Glu=0,367 mM, Asn=2,067 mM] (ver Anexo 3) se obtuvieron los valores de D que se presentan en la Tabla LXX.

Tabla LXX: Valores de la función deseabilidad global D calculados para la mezcla N°98, considerando los tres medios de cultivo en desarrollo (Zell-C12, Zell-C13 y Zell C14).

	Combinación	$D_{Zell-C12}$	$D_{Zell-C13}$	$D_{Zell-C14}$
(1)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	0,382	0,391	0,440
(2)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	0,447	0,458	0,526
(3)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	0,410	0,420	0,477
(4)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	0,481	0,492	0,571
(5)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	0,381	0,390	---
(6)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	0,446	0,457	---
(7)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	0,409	0,419	---
(8)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	0,480	0,491	---
(9)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	0,386	0,395	---
(10)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	0,462	0,463	---

(11)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	0,415	0,424	---
(12)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	0,486	0,497	---
(13)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	0,385	0,394	---
(14)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	0,451	0,546	---
(15)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	0,414	0,423	---
(16)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	0,485	0,496	---
(17)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	0,392	---	---
(18)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	0,460	---	---
(19)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	0,422	---	---
(20)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	0,494	---	---
(21)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	0,391	---	---
(22)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	0,459	---	---
(23)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	0,421	---	---
(24)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	0,493	---	---
(25)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	0,396	---	---
(26)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	0,464	---	---
(27)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	0,426	---	---
(28)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	0,499	---	---
(29)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	0,396	---	---
(30)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	0,630	---	---
(31)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	0,425	---	---
(32)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	0,498	---	---
(33)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	---	0,329	0,440
(34)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	---	0,385	0,526
(35)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	---	0,353	0,477
(36)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	---	0,414	0,571
(37)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	---	0,328	---
(38)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	---	0,384	---
(39)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	---	0,352	---
(40)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	---	0,413	---
(41)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	---	0,332	---
(42)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	---	0,389	---
(43)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	---	0,357	---
(44)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	---	0,418	---
(45)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	---	0,331	---
(46)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	---	0,388	---
(47)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	---	0,356	---
(48)	$(d_{\mu 2}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	---	0,417	---

En la Tabla LXX no se muestran los resultados repetidos: por ejemplo, se obtuvo el mismo valor para $D_{Zell-C12}$ en los casos (1) y (33), (2) y (34), (3) y (35), etc., debido a que

éstos difieren solamente en el resultado de d_i , la cual no forma parte de la expresión de $D_{Zell-C12}$. Por esta razón no se muestran los resultados de $D_{Zell-C12}$ para las combinaciones (33) a (48). Igual razonamiento se siguió para presentar los resultados de $D_{Zell-C13}$ y de $D_{Zell-C14}$.

En el ejemplo anterior los valores de D obtenidos variaron dentro de rangos relativamente pequeños: [0,381 ; 0,499] para $D_{Zell-C12}$ – con excepción del caso (30) –, [0,328 ; 0,546] para $D_{Zell-C13}$ y [0,440 ; 0,571] para $D_{Zell-C14}$. Esta observación se repitió para la mayoría de las mezclas integrantes del conjunto de prueba, si bien no para todas ellas, pudiéndose distinguir dos grandes grupos:

- **Mezclas para las que obtuvieron valores altos y relativamente constantes de $D_{Zell-C12}$, $D_{Zell-C13}$ y $D_{Zell-C14}$:** estas mezclas satisfacen todas las exigencias impuestas a través de las d_i .
- **Mezclas para las que se obtuvieron valores variables para $D_{Zell-C12}$, $D_{Zell-C13}$ y $D_{Zell-C14}$, pero relativamente constantes entre sí:** son mezclas que satisfacen los requerimientos de alguno de los medios en desarrollo, pero no de los otros.

Merece destacarse que a pesar de que las redes generadas para cada respuesta se obtuvieron en procesos independientes (es decir, procesos en los cuales la evolución en la asignación de los pesos w_i siguió caminos separados), y poseían arquitecturas diferentes, los valores obtenidos para cada definición de D fueron similares entre sí, para todas las posibles combinaciones de redes. Esto revela la robustez de los resultados obtenidos al utilizar redes neuronales artificiales para el modelado de procesos tan complejos como los que involucran sistemas biológicos.

En algunas mezclas en particular, se obtuvo un valor $D \neq 0$ cuando se utilizó d_{i1} y un valor $D=0$ cuando se utilizó d_{i2} (o viceversa), para una dada respuesta i . Estas son mezclas para las que las ANN1 y ANN2 predijeron respuestas cercanas a los límites de aceptación, una de las cuales se encuentra dentro del rango de valores aceptables (definidos por las diferentes expresiones de d_i), en tanto la otra no.

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

La selección de las mezclas de glucosa, galactosa, manosa, glutamina, glutamato y asparagina para los cuales se obtuvieron los mejores valores de la función deseabilidad global se basó en el criterio de robustez del análisis. Se seleccionaron así aquellas mezclas que mostraron los mejores resultados en forma repetida, ya sea que se utilizara la ANN1 o

la ANN2 para la predicción de las respuestas.

Para el caso del medio de cultivo Zell-C12, la identificación de estas mezclas se llevó a cabo de la siguiente manera:

- i. Se ordenaron en forma decreciente los 800 valores de $D_{Zell-C12}$ calculados utilizando la combinación de d_{ICV1} , d_{qlac1} , d_{qam1} , $d_{qrhEPO1}$ y d_{ABt1} (combinación (1) de la Tabla LXXI).
- ii. Se repitió el paso anterior para cada una de las combinaciones restantes de d_{ICV} , d_{qlac} , d_{qam} , d_{qrhEPO} y d_{ABt} que se presentaron en la Tabla LXXI.
- iii. Se seleccionaron las mezclas del conjunto de prueba que dieron origen a los 3 valores más altos de $D_{Zell-C12}$ obtenidos para cada combinación de d_{ICV} , d_{qlac} , d_{qam} , d_{qrhEPO} y d_{ABt} . (3 mezclas por 32 combinaciones de d_i da un total de 96 mezclas pre-seleccionadas para la definición del medio Zell-C12). Las mezclas pre-seleccionadas se muestran en la Tabla LXXI.

Tabla LXXI: Mezclas pre-seleccionadas en función de los valores más altos de D calculados para el medio Zell-C12.

	Combinación	Posición	Mezcla N°	$D_{Zell-C12}$
(1)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	1°	538	0,748
		2°	315	0,693
		3°	307	0,681
(2)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	1°	304	0,805
		2°	538	0,717
		3°	518	0,713
(3)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	1°	538	0,816
		2°	410	0,794
		3°	122	0,754
(4)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	1°	304	0,801
		2°	318	0,788
		3°	538	0,782
(5)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	1°	538	0,750
		2°	315	0,691
		3°	307	0,680
(6)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	1°	304	0,805
		2°	538	0,719
		3°	518	0,715
(7)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	1°	538	0,817
		2°	410	0,795
		3°	122	0,755
(8)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t2})$	1°	304	0,801
		2°	518	0,789
		3°	538	0,783
(9)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	1°	538	0,752
		2°	315	0,691
		3°	122	0,689
(10)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t2})$	1°	303	0,824
		2°	304	0,812
		3°	538	0,721
(11)	$(d_{\mu1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	1°	538	0,820
		2°	410	0,789
		3°	122	0,765

(12)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{i2})$	1°	303	0,821
		2°	304	0,808
		3°	518	0,789
(13)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	1°	538	0,754
		2°	315	0,689
		3°	122	0,689
(14)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{i2})$	1°	303	0,824
		2°	304	0,812
		3°	538	0,722
(15)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	1°	538	0,822
		2°	410	0,790
		3°	122	0,766
(16)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV1}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{i2})$	1°	303	0,820
		2°	304	0,807
		3°	518	0,790
(17)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	1°	538	0,729
		2°	307	0,680
		3°	122	0,679
(18)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{i2})$	1°	304	0,792
		2°	518	0,713
		3°	538	0,698
(19)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	1°	538	0,794
		2°	410	0,794
		3°	122	0,754
(20)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{i2})$	1°	304	0,788
		2°	518	0,788
		3°	538	0,761
(21)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	1°	538	0,730
		2°	122	0,679
		3°	307	0,679
(22)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{i2})$	1°	304	0,792
		2°	518	0,715
		3°	538	0,700
(23)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	1°	538	0,796
		2°	410	0,795
		3°	122	0,755
(24)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac1}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{i2})$	1°	518	0,789
		2°	304	0,788
		3°	538	0,762
(25)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	1°	538	0,783
		2°	122	0,689
		3°	307	0,677
(26)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO1}, AB_{i2})$	1°	303	0,814
		2°	304	0,798
		3°	518	0,714
(27)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	1°	538	0,798
		2°	410	0,789
		3°	122	0,765
(28)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam1}, d_{qrhEPO2}, AB_{i2})$	1°	303	0,810
		2°	304	0,795
		3°	518	0,789
(29)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{t1})$	1°	538	0,734
		2°	122	0,689
		3°	307	0,676
(30)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO1}, AB_{i2})$	1°	303	0,814
		2°	304	0,798
		3°	518	0,716
(31)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{t1})$	1°	538	0,800
		2°	410	0,790
		3°	122	0,766
(32)	$(d_{\mu 1}, d_{ICV2}, d_{qlac2}, d_{qam2}, d_{qrhEPO2}, AB_{i2})$	1°	303	0,810
		2°	304	0,794
		3°	518	0,790

- iv. Se calculó la frecuencia de aparición de cada mezcla en el conjunto de 96 mezclas.
- v. Se calculó el promedio de los valores $D_{Zell-C12}$ de cada mezcla.
- vi. Se ordenaron las mezclas en forma decreciente de acuerdo con su frecuencia de aparición.
- vii. En el caso de mezclas con igual frecuencia de aparición, éstas se ordenaron en forma decreciente de acuerdo con sus valores de $D_{Zell-C12}$ promedio (Tabla LXXII).

Tabla LXXII: Ordenamiento decreciente de las mezclas pre-seleccionadas para el medio Zell-C12 en función de su frecuencia de aparición. *Fa* = frecuencia absoluta; *Fr* = frecuencia relativa.

Mezcla N°	<i>Fa</i>	<i>Fr</i> (n=96)	$D_{Zell-C12}$	Glc (mM)	Gal (mM)	Man (mM)	Gln (mM)	Glu (mM)	Asn (mM)
538	26	27,1%	0,761	0,000	6,250	18,750	1,417	1,133	2,550
304	16	16,7%	0,800	25,000	0,000	0,000	2,000	2,325	0,775
518	14	14,6%	0,755	0,000	6,250	18,750	2,000	0,775	2,325
122	14	14,6%	0,728	4,170	4,170	16,670	1,417	1,133	2,550
303	8	8,3%	0,817	25,000	0,000	0,000	2,667	2,067	0,367
410	8	8,3%	0,792	2,333	2,333	20,333	1,417	1,133	2,550
307	6	6,3%	0,679	25,000	0,000	0,000	0,000	3,400	1,700
315	4	4,2%	0,691	25,000	0,000	0,000	0,567	2,863	1,670

Para la pre-selección de las mezclas utilizadas para definir los medios Zell-C13 y Zell-C14 se siguió un procedimiento análogo al descrito. Las Tablas LXXIII y LXXIV resumen los resultados obtenidos.

Tabla LXXIII: Ordenamiento decreciente de las mezclas pre-seleccionadas para el medio Zell-C13 en función de su frecuencia de aparición. *Fa* = frecuencia absoluta; *Fr* = frecuencia relativa.

Mezcla N°	<i>Fa</i>	<i>Fr</i> (n=96)	$D_{Zell-C13}$	Glc (mM)	Gal (mM)	Man (mM)	Gln (mM)	Glu (mM)	Asn (mM)
303	8	8,3%	0,751	25,00	0,00	0,00	2,667	2,067	0,367
304	8	8,3%	0,715	25,00	0,00	0,00	2,000	2,325	0,775
386	8	8,3%	0,673	2,33	2,33	20,33	2,667	0,367	2,067
62	8	8,3%	0,549	0,00	25,00	0,00	3,400	1,033	0,667
480	8	8,3%	0,497	6,25	18,75	0,00	2,267	1,333	1,500
479	6	6,3%	0,549	6,25	18,75	0,00	2,267	1,500	1,333
90	6	6,3%	0,688	12,50	12,50	0,00	1,417	1,133	2,550

458	6	6,3%	0,474	6,25	18,75	0,00	2,000	1,550	1,550
41	4	4,2%	0,758	0,00	25,00	0,00	3,000	1,325	0,775
40	4	4,2%	0,727	0,00	25,00	0,00	3,000	1,050	1,050
453	4	4,2%	0,671	6,25	18,75	0,00	1,000	0,775	3,325
454	4	4,2%	0,664	6,25	18,75	0,00	2,000	0,775	2,325
470	4	4,2%	0,659	6,25	18,75	0,00	0,850	0,283	3,967
474	4	4,2%	0,654	6,25	18,75	0,00	1,417	1,133	2,550
514	4	4,2%	0,597	0,00	6,25	18,75	2,667	0,367	2,067
361	2	2,1%	0,596	2,33	20,33	2,33	3,000	1,325	0,775
360	2	2,1%	0,581	2,33	20,33	2,33	3,000	1,050	1,050
559	2	2,1%	0,559	18,75	0,00	6,25	2,667	2,067	0,367
578	2	2,1%	0,515	6,25	0,00	18,75	2,667	0,367	2,067
348	2	2,1%	0,470	20,33	2,33	2,33	0,567	1,670	2,863

Tabla LXXIV: Ordenamiento decreciente de las mezclas pre-seleccionadas para el medio Zell-C14 en función de su frecuencia de aparición. *Fa* = frecuencia absoluta; *Fr* = frecuencia relativa.

Mezcla N°	<i>Fa</i>	<i>Fr</i> (n=24)	<i>D</i> _{Zell-Cperf}	Glc (mM)	Gal (mM)	Man (mM)	Gln (mM)	Glu (mM)	Asn (mM)
538	6	25,0%	0,801	0,000	6,250	18,750	1,417	1,133	2,550
303	4	16,7%	0,881	25,000	0,000	0,000	2,667	2,067	0,367
304	4	16,7%	0,865	25,000	0,000	0,000	2,000	2,325	0,775
410	2	8,3%	0,849	2,333	2,333	20,333	1,417	1,133	2,550
47	2	8,3%	0,846	0,00	25,00	0,00	2,667	2,067	0,367
518	2	8,3%	0,835	0,000	6,250	18,750	2,000	0,775	2,325
315	2	8,3%	0,778	25,000	0,000	0,000	0,567	2,863	1,670
109	2	8,3%	0,769	4,170	4,170	16,670	1,000	2,050	2,050

En primer lugar se observó que se obtuvieron altos valores de deseabilidad global, para todos los casos. La mezcla número 538 se presentó con mayor frecuencia entre aquellas pre-seleccionadas tanto para el medio Zell-C12 (27,1% de las veces) como para el medio usado en la fase de perfusión de un cultivo continuo, Zell-C14 (25%), confirmando que esta combinación de factores permitiría alcanzar satisfactoriamente la finalidad de estos dos medios de cultivo. Esta mezcla no fue, sin embargo, pre-seleccionada para el medio Zell-C13, debido a la restricción impuesta a la respuesta μ .

Las mezclas 303 y 304, por otro lado, resultaron ser apropiadas para su uso en todas las condiciones requeridas; es decir, para el cultivo por lote y para ambas etapas del cultivo continuo. Estas mezclas contienen exclusivamente glucosa, el azúcar más

rápida mente metabolizable entre los estudiados, y un contenido reducido de glutamina (aproximadamente 50% de la concentración presente en el medio comercial SMIF 6). La baja concentración de este aminoácido evitaría que se acumularan grandes cantidades de amonio en el sobrenadante de cultivo, favoreciendo la síntesis de las isoformas más glicosiladas de rhEPO, en tanto que la alta disponibilidad de glucosa permitiría alcanzar velocidades de crecimiento más altas compatibles con las exigencias de la etapa inicial del cultivo continuo.

7.4.2.10. Definición de los medios de cultivo Zell-C12, Zell-C13 y Zell-C14

En base al análisis anterior, se seleccionaron las siguientes composiciones optimizadas de los medios de cultivo en desarrollo (Tabla LXXV):

Tabla LXXV: Medios de cultivo diseñados mediante la utilización de ANN para el modelado de las respuestas y la función *D* para la selección de las mezclas de factores.

Mezcla N°	Medio	Glc (mM)	Gal (mM)	Man (mM)	Gln (mM)	Glu (mM)	Asn (mM)
538	Zell-C12	0,000	6,250	18,750	1,417	1,133	2,550
303	Zell-C13	25,000	0,000	0,000	2,667	2,067	0,367
538	Zell-C14	0,000	6,250	18,750	1,417	1,133	2,550

La composición del medio de cultivo formulado para la producción de rhEPO en cultivos por lote (medio Zell-C12) puede ser comparada con las previamente obtenidas utilizando la metodología de superficies de respuesta mediante el análisis simple (medios Zell-C9 y Zell-C10) y el análisis integral (medio Zell-C11) de las respuestas, según se muestra en la Tabla LXXVI.

Tabla LXXVI: Medios de cultivo optimizados siguiendo diferentes metodologías de análisis, para la producción de rhEPO en cultivo por lote.

Metodología	Medio	Glc (mM)	Gal (mM)	Man (mM)	Gln (mM)	Glu (mM)	Asn (mM)
RSM (análisis simple)	Zell-C9	8,29	1,22	15,49	0,00	0,00	5,1
	Zell-C10	17,84	0,00	7,16	0,00	2,55	2,55
RSM (análisis integral)	Zell-C11	13,84	0,37	10,79	0,10	2,13	2,87
ANN	Zell-C12	0,00	6,25	18,75	1,42	1,13	2,55

Las características más relevantes compartidas por los medios de cultivo Zell-C9, Zell-C10, Zell-C11 y Zell-C12 son:

- alta proporción de manosa
- alta proporción de asparagina
- baja proporción de glutamina

Dichas características no son encontradas en los medios de cultivo comúnmente comercializados, lo que destaca su importancia como medios especialmente optimizados para la producción de la rhEPO por el clon productor en estudio.

7.5. CONCLUSIONES

- Se entrenaron varias redes de diferente arquitectura para realizar el ajuste de las respuestas en estudio, obteniéndose valores de D similares para cada definición de esta función. Este hecho resalta la robustez de esta metodología para el modelado de procesos tan complejos como los que involucran sistemas biológicos.
- Al utilizar los resultados predichos por estas redes para generar los diferentes valores de d_i y de D , se observó que para ciertas mezclas de los seis factores en estudio se obtuvieron valores altos y relativamente constantes de $D_{Zell-C12}$, $D_{Zell-C13}$ y $D_{Zell-C14}$, por lo que estas mezclas satisfacen todos los requerimientos exigidos a los tres medios de cultivo.
- Otras mezclas presentaron valores variables de $D_{Zell-C12}$, $D_{Zell-C13}$ y $D_{Zell-C14}$, pero relativamente constantes entre sí. Estas mezclas satisfacen los requerimientos de alguno de los medios en desarrollo, pero no de los otros dos.
- La mezcla número 538 fue seleccionada tanto para el medio Zell-C12 (proceso de producción por lote) como para el medio usado en la fase de perfusión de un cultivo continuo, Zell-C14. La composición de esta mezcla es [Glc=0,0 mM; Gal=6,25 mM; Man=18,75 mM; Gln=1,417 mM; Glu=1,133 mM; Asn=2,550 mM].
- La mezcla número 303 fue seleccionada como el medio óptimo para la fase de rápido crecimiento inicial del cultivo continuo, y posee la composición [Glc=25,0 mM; Gal=0,0 mM; Man=0,0 mM; Gln=2,667 mM; Glu=2,067 mM; Asn=0,367 mM].
- Entre las características más sobresalientes de las mezclas optimizadas tanto por RSM como por ANN para la producción de rhEPO en procesos por lote se destaca, en primer lugar, la presencia de un alto contenido de manosa, un azúcar que no se encuentra

normalmente presente en los medios de cultivo comerciales.

- En segundo lugar, si bien Gln y Asn son dos aminoácidos usualmente encontrados en medios de cultivo, la alta concentración de asparagina en detrimento de la concentración de glutamina en los medios optimizados resulta de por sí novedosa, considerando que la selección de las concentraciones de estos aminoácidos se realizó en función de la calidad glicosídica de la molécula producida.
- Finalmente, a pesar de haberse analizado los resultados experimentales mediante dos metodologías esencialmente diferentes como son las superficies de respuesta y el entrenamiento de redes neuronales artificiales, los resultados obtenidos son consistentes entre sí. Esto indica que ambas metodologías son confiables para ser utilizadas en el modelado de múltiples respuestas para la optimización de procesos productivos.

8-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

CAPÍTULO 5

8. EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO OPTIMIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE rhEPO EN CULTIVO CONTINUO EN UN BIORREACTOR CON PERFUSIÓN

8.1. OBJETIVOS

Evaluar el desempeño de los medios de cultivos definidos desarrollados en este trabajo de tesis para la producción de rhEPO a alta densidad celular en un biorreactor en modo continuo con perfusión de medio de cultivo.

8.2. INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares en gran escala se iniciaron en la década de 1960, con la adaptación a suspensión de células BHK (Arathoon y Birch, 1986), y desde esas primeras experiencias el campo de aplicación de esta tecnología se ha ampliado marcadamente. La productividad volumétrica de estos sistemas productivos se encuentra directamente relacionada a la densidad celular alcanzada por ellos, por lo que desde el inicio de la aplicación de los cultivos celulares para la obtención de productos biológicos (moléculas recombinantes, virus, etc.) se han estudiado nuevos sistemas que permitan aumentar las concentraciones de células alcanzadas en ellos.

Si se asume que un determinado proceso productivo de alta densidad celular es capaz de proveer un micro-ambiente óptimo para las células, cada una de ellas tendrá la misma productividad que si fuera cultivada en un sistema de baja densidad celular (en modo *batch*, por ejemplo), y consecuentemente se obtendrá una mayor productividad volumétrica en aquel sistema. Este hecho, a su vez, redundará en un menor requerimiento de espacio en planta, y en la utilización de reactores de menor tamaño (Griffiths, 1992; Tyo y Spier, 1987). Los procesos continuos con perfusión de medio de cultivo son, entre los procesos productivos basados en el cultivo de células en suspensión, los sistemas que permiten alcanzar las densidades celulares más altas.

El escalamiento de los procesos que involucran altas densidades celulares resulta generalmente complicado, debido principalmente a limitaciones en la transferencia de masa (en particular, del oxígeno). Otra dificultad asociada a estos sistemas productivos es el requerimiento de equipamientos complejos para el control del proceso: en un cultivo de alta densidad celular una ligera demora en el ajuste de los parámetros puede conducir rápidamente a condiciones ambientales inapropiadas para el mantenimiento de la vida

celular. Las intervenciones de la unidad de control automatizada del reactor deben ser frecuentes y la sensibilidad de respuesta del sistema, alta. La posibilidad de que ocurra una falla, entonces, se ve incrementada debido a la mayor complejidad del sistema de control.

Las limitaciones en el escalamiento del proceso, el requerimiento de equipamientos especializados, y la alta productividad obtenida en reactores de volumen relativamente pequeño (menores a 100 l) explican por qué estos sistemas se emplean preferentemente en la elaboración de productos de elevada actividad biológica específica, como es el caso de la rhEPO.

8.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El clon B1A2 fue cultivado en alta densidad, en un biorreactor en modo continuo con perfusión de medio de cultivo.

En esta experiencia se utilizaron dos medios de cultivos, desarrollados en base a los resultados presentados en el Capítulo 4 de este trabajo de tesis. El primer medio de cultivo fue empleado con el objetivo de favorecer el desarrollo de la masa celular, antes de iniciar el proceso de perfusión, mientras que el segundo medio de cultivo se utilizó para perfundir el reactor durante la etapa productiva.

8.4. RESULTADOS

8.4.1. Medios de cultivo evaluados

A partir de los resultados experimentales presentados hasta aquí, se procedió a preparar dos medios para ser utilizados en el cultivo del clon B1A2 en un biorreactor de 5 l.

El cultivo fue dividido en dos etapas: la primera de ellas, denominada **etapa de crecimiento**, corresponde a la fase inicial del cultivo, en donde se buscó estimular el crecimiento celular. Una vez alcanzada una densidad celular adecuada, se inició el proceso de perfusión (**etapa de producción**) con el segundo medio de cultivo.

Los medios de cultivo analizados fueron:

- **Medio de cultivo Zell-C13:** definido mediante el diseño experimental de mezclas cruzadas y posterior análisis de las respuestas mediante la utilización de redes neuronales artificiales, seguido de un proceso de optimización a través del cálculo de la función deseabilidad global D . Este medio de cultivo, utilizado durante la etapa de

crecimiento, contenía exclusivamente glucosa como fuente de carbono, y glutamina, como principal fuente de nitrógeno.

- **Medio de cultivo Zell-C14:** utilizado durante la etapa de producción para perfundir el cultivo. Este medio contenía mayoritariamente manosa y asparagina.

La composición de los medios empleados se resume en la Tabla LXXVII.

Tabla LXXVII: Composición de los medios utilizados para el cultivo del clon B1A2 en modo continuo con perfusión, en un biorreactor de 5 l.

Medio	Glc (mM)	Gal (mM)	Man (mM)	Gln (mM)	Glu (mM)	Asn (mM)
Zell-C13	25,000	0,000	0,000	2,667	2,067	0,367
Zell-C14	0,000	6,250	18,750	1,417	1,133	2,550

8.4.2. Configuración del biorreactor empleado

El cultivo del clon B1A2 se realizó en un biorreactor de 5 l, tipo tanque agitado, con un sistema de perfusión de medio de cultivo (Modelo ALF, Bioengineering AG, Suiza). El biorreactor utilizado en las experiencias descritas en este capítulo se presenta esquemáticamente en la Fig. 66, y posee los siguientes dispositivos:

Dispositivo de agitación: Consiste en un eje de acero inoxidable 316L al cual se sujeta una hélice de tipo marina con cuatro palas en ángulo de 30°. El giro del eje se logra mediante un acople magnético con el motor ubicado externamente por debajo de la base del reactor, por lo que no existe una conexión directa entre el eje del motor de agitación y el eje de agitación en el reactor, evitándose así una posible contaminación.

Dispositivo de perfusión interno: Está formado por un filtro rotatorio (*spin-sieve*) constituido por un soporte cilíndrico de acero inoxidable 316L al cual se adosa una malla también de acero inoxidable 316L de 20 µm de diámetro de red, lo que impide el pasaje de células – pero no de medio de cultivo – desde la parte externa del *spin-sieve* al interior del mismo. El modo de filtración que se produce es de tipo tangencial, siendo la unidad del filtro la que se desplaza en forma tangencial respecto al medio, el cual es filtrado hacia el interior del *spin-sieve*.

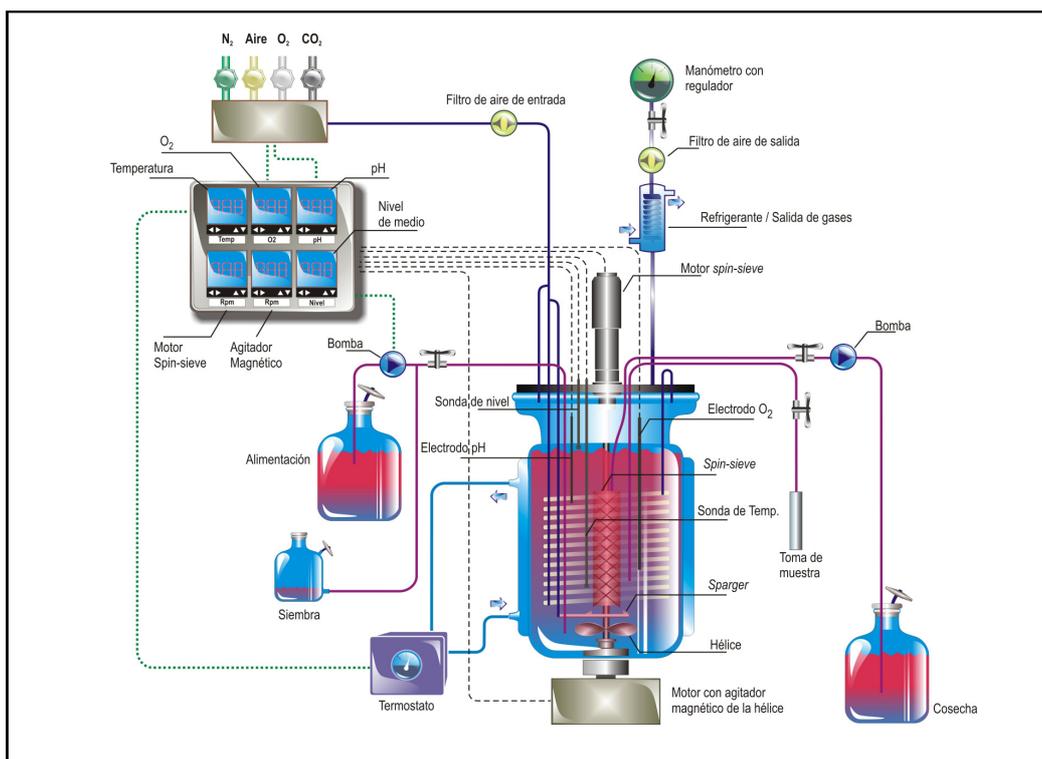


Fig. 66: Esquema del biorreactor de agitación con perfusión.

Dispositivo de ingreso de gases: Este dispositivo está conectado tanto a la estación de mezcla de gases como a un filtro-cartucho de membrana hidrofóbica PTFE de $0,2\ \mu\text{m}$ de tamaño medio de poro (Midisart 2000[®], Sartorius, Alemania), para la esterilización de los gases de entrada. El ingreso de gases al biorreactor se realiza por tres vías:

- A través del *sparger* (burbujeador), con difusores de acero sinterizado CrNiMo (modelo SIKA-R 20, Krebsöge AG, Alemania), cuyo tamaño medio de poro es $20\ \mu\text{m}$.
- Por la cámara superior (volumen contenido entre el nivel del medio y la tapa).
- A través del dispositivo de aireación libre de burbujas, constituido por una manguera de silicona de $1,5\ \text{mm}$ de diámetro interno y $1,9\ \text{mm}$ de diámetro externo.

Dispositivo de salida de gases: Está constituido por un refrigerante, destinado a la condensación del vapor de agua en los gases de salida y el posterior reflujó del agua condensada al recipiente, evitando así aumentos de la osmolaridad del medio. A la salida del refrigerante están conectados – en serie – un filtro hidrofóbico (Midisart 2000[®], Sartorius, Alemania) y un manómetro. Los gases de salida se filtran mediante un cartucho esterilizante para evitar la contaminación del reactor por reflujó de aire del medio ambiente.

Electrodos:

- **Oxígeno:** Su señal está acoplada a una válvula que regula el caudal de entrada de aire y/u oxígeno proveniente de la estación de mezcla de gases, permitiendo automáticamente el ajuste y mantenimiento del valor de pO_2 en el cultivo.
- **pH:** Su señal está acoplada a una válvula que regula el caudal de CO_2 , de manera que ante un aumento del pH del medio de cultivo por encima del valor preestablecido, automáticamente aumenta el flujo de CO_2 en la mezcla de entrada de gases hasta restablecer el valor del *set point*.

Sensor de nivel de medio: El volumen de trabajo del biorreactor está determinado por este sensor, ya que su señal está acoplada a la bomba de ingreso de medio de cultivo (alimentación). En el caso de que el nivel de medio en el reactor alcance dicha sonda, se apaga la bomba peristáltica de la alimentación de medio, evitando una sobrecarga del mismo.

Sensor de temperatura: Este sensor registra en forma continua la temperatura del cultivo, y su señal controla el baño de agua externo para regular y mantener la temperatura de cultivo.

Dispositivo de toma de muestra: Consiste en un tubo de acero inoxidable 316L sumergido en el seno del medio de cultivo por fuera del *spin-sieve* para acceder a la suspensión celular. Por fuera y encima de la tapa, este tubo está conectado a una manguera de silicona (cuya longitud permite manipular la toma de muestra en el interior de una cabina de flujo laminar ubicada al lado del biorreactor), la cual está conectada en su otro extremo a una aguja de acero inoxidable 316L mantenida en una camisa estanca para asegurar su hermeticidad. La muestra se toma impulsando la suspensión celular desde el biorreactor mediante el aumento de la presión de la cámara superior.

Dispositivo de agregado de inóculo: Consiste en un tubo de acero inoxidable 316L sumergido en el seno del medio de cultivo, por fuera del *spin-sieve*. Por fuera y encima de la tapa, este tubo está conectado a una manguera de silicona, la cual, a su vez, está unida a un conector de acero inoxidable 316L en forma de cruz. Este conector permite recibir tanto la manguera de silicona proveniente de la botella de siembra como la del reservorio de medio de alimentación (ver más adelante), quedando la tercera vía disponible para el

ingreso de vapor de agua, empleado en la esterilización de las mangueras durante la operación del biorreactor (ver más adelante). La botella de siembra consiste en un frasco de vidrio borosilicato (Schott Glaswerke AG, Alemania) de 2 l de capacidad con tapa autoclavable a rosca de polipropileno con dos entradas laterales: una superior, a la cual está conectada un filtro autoclavable de aire de poro medio 0,3 μm ; y otra inferior (justo por encima de la base) a la cual está conectada la manguera de silicona proveniente del conector en forma de cruz. La apertura y el cierre de la botella se realizan dentro de la cabina de flujo laminar, y de esta manera, el inóculo celular que se mantiene en la estufa de cultivo se introduce en forma estéril en esta botella de siembra. Para realizar la siembra se debe evitar que el inóculo ingrese en la manguera de alimentación comunicada mediante el conector tipo cruz, siendo para ello necesario cerrar su paso mediante una abrazadera. La siembra se realiza permitiendo que la suspensión celular ingrese en el biorreactor por gravedad, ubicando la botella por encima del recipiente del biorreactor, en ausencia de una sobrepresión de la cámara superior y con la salida de gases del reactor abierta.

Dispositivo de alimentación de medio de cultivo: Utiliza el mismo tubo de acero inoxidable que el de agregado de inóculo. Se emplea una manguera de silicona unida al conector tipo cruz mientras que el otro extremo de esta manguera está conectado a una aguja de acero inoxidable, mantenida en una camisa estanca para asegurar su esterilidad. La conexión de esta aguja al recipiente que contiene el medio de cultivo se realiza en la cabina de flujo laminar ubicada al lado del biorreactor, evitando así la contaminación de la aguja al retirar la camisa. El medio de cultivo se agrega al biorreactor en forma continua impulsado por una bomba peristáltica (Peripex W1, Bioengineering AG, Suiza) de caudal variable y evitando que esta alimentación ingrese en la manguera del inóculo, para lo cual se cierra el paso de esta última con una abrazadera. El volumen diario de alimentación se regula para mantener en forma adecuada la viabilidad del cultivo, y se expresa en referencia al volumen de trabajo del reactor ($V_R \text{ d}^{-1}$).

Dispositivo de cosecha de medio de cultivo libre de células: Consiste en un tubo de acero inoxidable 316L sumergido en el interior del *spin-sieve*. Por fuera y encima de la tapa, este tubo está conectado a una manguera de silicona cuyo otro extremo está conectado a una aguja de acero inoxidable 316L, estéril. La conexión de esta aguja al recipiente de cosecha se realiza bajo flujo laminar. La cosecha se realiza desde el interior del *spin-sieve*, que en ningún momento contiene células durante el cultivo, en forma continua impulsado por una bomba peristáltica (Peripex W1, Bioengineering AG, Suiza) de caudal variable. El

volumen de cosecha es igual al volumen de alimentación, de manera de mantener constante el volumen de trabajo del reactor. El recipiente de la cosecha se mantiene en heladera a una temperatura de 4°C. Tanto el recipiente de la alimentación como el de cosecha son frascos autoclavables de polipropileno (Nalgene®, Nalge Nunc Internacional, EE.UU.) de 50 l de capacidad.

Estación de mezcla de gases: Consiste en un gabinete que contiene los reductores de presión de gases de entrada (aire, N₂, CO₂ y O₂), las válvulas que regulan el caudal de los mismos, los manómetros indicadores de presión de trabajo (fijados manualmente en 1 bar) y los rotámetros que indican el caudal. La salida de cada uno de los gases se colecta en una única manguera que se conecta con el filtro hidrofóbico para la esterilización de la mezcla gaseosa antes de su ingreso al biorreactor.

Unidad de comando y regulación: Consiste en varias unidades de control, las cuales funcionan como un controlador universal que puede medir y regular diferentes variables físicas. En este caso se dispone de seis controladores para temperatura, velocidad de agitación, velocidad de rotación del *spin-sieve*, pO₂, pH y sensor de nivel, los que están agrupados en un gabinete (Fig. 5). Cada controlador está formado por dos partes: el módulo del monitor o *display* y el módulo frontal inteligente (IFM®, *Intelligent Front Module*, Bioengineering AG, Suiza). El módulo del monitor muestra los valores medidos *on-line* y los pulsadores para la programación de la variable (valores *set point* y valores de alarma). El módulo IFM® puede ser usado para el control manual o automático de las variables, y los datos son procesados mediante el *software* Biologg® (Bioengineering IFM DataLogging Software). En la computadora conectada a los controladores se registran en forma continua las siguientes variables:

- Número de rotaciones de la hélice, expresadas en rpm.
- Número de rotaciones del tamiz rotatorio (*spin-sieve*), expresadas en rpm.
- pO₂ del medio de cultivo en el recipiente del biorreactor, expresado como porcentaje de saturación de aire.
- Temperatura del medio de cultivo en el recipiente del biorreactor, en °C.
- pH del medio de cultivo en el recipiente del biorreactor.

La esterilización del biorreactor antes de la siembra del inóculo se realiza en autoclave a 121 °C durante 1 h con todos los accesorios conectados a la tapa, incluyendo las

sondas (pO_2 , pH, nivel de medio y temperatura) y el conjunto de mangueras que conectan las vías de ingreso y salida de gases a los respectivos filtros y a 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. Luego de la esterilización se monta el reactor sobre el motor de agitación, y se conectan los cables de todas las sondas y el motor del *spin-sieve*.

Una vez iniciado el cultivo, la esterilidad de las mangueras conectadas a los dispositivos de toma de muestra, de alimentación y de cosecha se mantiene por inyección de vapor de agua desde un generador de vapor externo. Durante la esterilización por calor de estas mangueras se evita el ingreso de vapor al biorreactor mediante el cierre de su paso con abrazaderas. Por simplicidad, en el esquema de la Fig. 66 no se muestran las conexiones entre todas las mangueras y sus respectivas abrazaderas, que aseguran que el vapor de agua fluya por todas ellas.

8.4.3. Cultivo del clon B1A2 en el biorreactor

El clon B1A2 fue cultivado en un frasco *spinner* en medio SMIF 6, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Esta suspensión fue centrifugada por 10 min a 200 *g*, y el *pellet* celular fue resuspendido en el medio de cultivo Zell-C13, inoculándose el biorreactor a una densidad celular de aproximadamente $3,5 \times 10^5$ cél. viab. ml^{-1} . El volumen inicial de cultivo fue de 3,5 l.

El control del proceso se realizó diariamente, determinándose la concentración de células viables y totales, glucosa, lactato, amonio y rhEPO. Se registró también el valor de pH indicado por la unidad de control al momento de la toma de muestra, y se determinó la osmolalidad del sobrenadante de cultivo. La primera fase de amplificación celular se realizó en modo *batch*. Una vez alcanzada una densidad celular limitante para el crecimiento, se inició el proceso de perfusión con el mismo medio de cultivo Zell-C13 para continuar con el desarrollo de la masa celular.

Para iniciar la etapa de producción, se sustituyó el medio Zell-C13 por el medio Zell-C14 para la perfusión del cultivo, realizándose el cambio del recipiente de cosecha para evitar la mezcla de los sobrenadantes. Los eventos más importantes en el proceso de cultivo se resumen en la Tabla LXXVIII.

Tabla LXXVIII: Proceso de cultivo del clon B1A2 en un biorreactor de 5 l, en modo de cultivo continuo con perfusión, utilizando los medios de cultivo Zell-C13 y Zell-C14.

Día	Evento
0	Inicio del cultivo en medio Zell-C13 (volumen de trabajo = 3,5 l)
3	Aumento del volumen de trabajo a 4,5 l con medio Zell-C13
6	Inicio de la perfusión del medio de cultivo Zell-C13
12	Volumen de cosecha (medio Zell-C13): aproximadamente 41 l. Inicio de la perfusión del medio de cultivo Zell-C14
17	Volumen de cosecha (medio Zell-C14): aproximadamente 36 l. Fin del cultivo.

Las curvas metabólicas características obtenidas a partir de los datos del cultivo, así como las curvas de parámetros fisicoquímicos, se muestran en la Fig. 67. Las líneas de puntos identifican cuatro fases diferentes del cultivo: la **fase A** corresponde al período que se extiende entre el inicio del cultivo y el día de inicio de la perfusión con el medio Zell-C13; la **fase B** comprende los días 6 a 8, en los cuales se verificó un cambio en el comportamiento celular – comentado más adelante –; la **fase C** que corresponde a los días 8 a 12, momento en el cual se inició la perfusión con el medio Zell-C14; y finalmente la **fase D** que va desde el día 12 hasta el final del cultivo, el día 17.

Los parámetros metabólicos específicos del cultivo se calcularon individualmente para cada fase, a partir de los gráficos de producción y consumo acumulados en función de la ICV (Fig. 68). Estos parámetros se presentan en la Tabla LXXIX, así como los valores de rendimiento de lactato a partir de glucosa.

Puede observarse que la concentración de células viables se incrementó sostenidamente durante la fase de crecimiento en la cual se utilizó el medio Zell-C13 (fase A). El día 6 se inició la perfusión del cultivo con este mismo medio, a baja velocidad, sustituyéndose aproximadamente un 22% del volumen de trabajo en las siguientes 24 h. Este procedimiento permitió el aumento de la concentración celular, la cual se incrementó de $8,2 \times 10^5$ a 2×10^6 cél. viab. ml⁻¹ en este período, representando un incremento de más del 240%.

A raíz de esta observación se tomó la decisión de aumentar la velocidad de perfusión en el día 7 del cultivo. Este hecho, sin embargo, pudo haber ejercido un efecto negativo sobre el crecimiento celular, ya que inmediatamente después se verificó una disminución en la concentración de células; la variación en la concentración de células en esta fase del cultivo (aumento entre los días 6 y 7, y posterior disminución entre los días 7 y 8) impidió la determinación del valor de μ para la fase B.

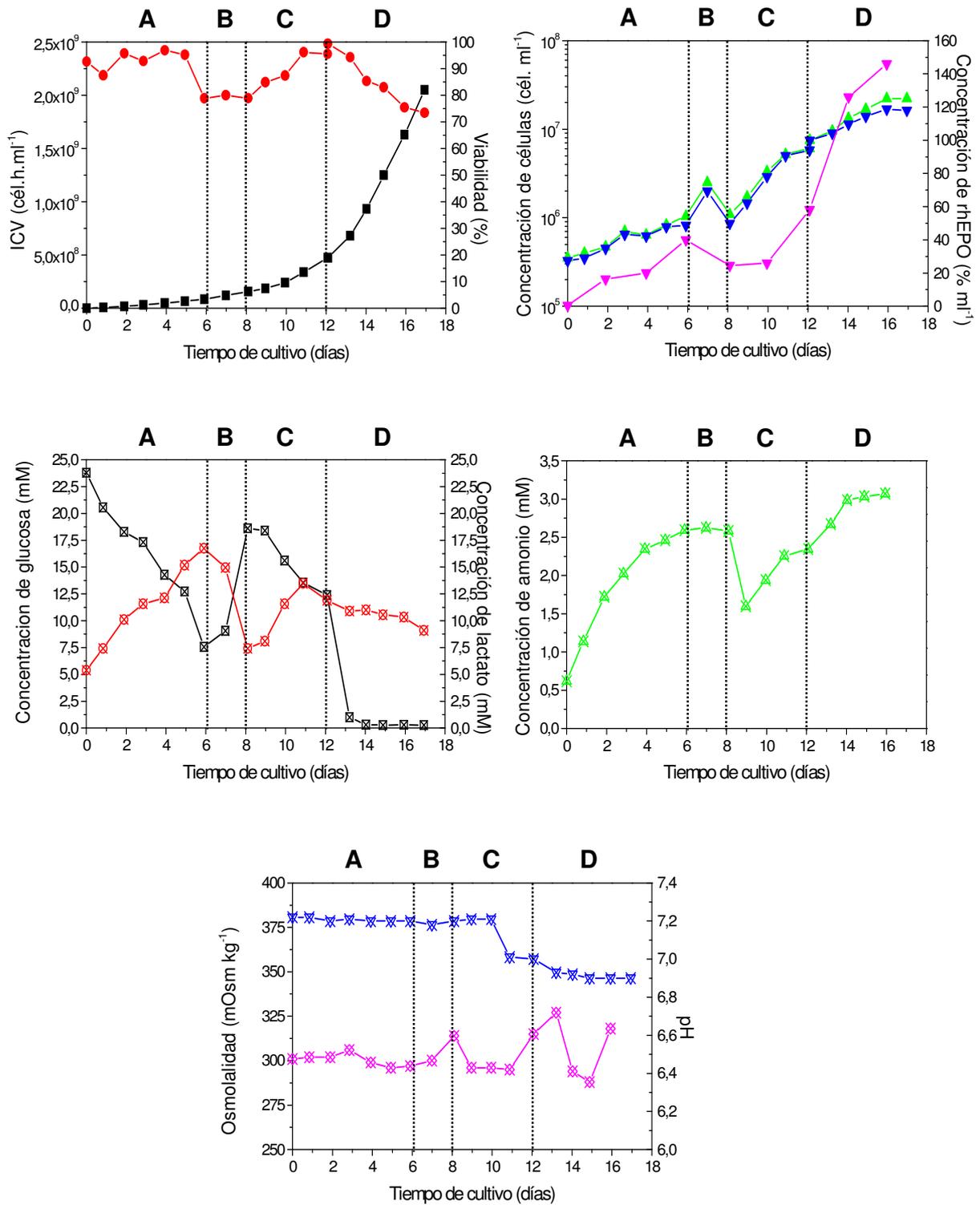


Fig. 67: Curvas metabólicas en función del tiempo de cultivo obtenidas para el clon B1A2 cultivado en modo continuo con perfusión en un biorreactor de 5 l, y curvas de parámetros fisicoquímicos: (■) ICV; (●) viabilidad; (▲) células totales; (▼) células viables; (◆) rhEPO; (⊠) glucosa; (⊗) lactato; (△) amonio; (▽) pH y (◇) osmolalidad.

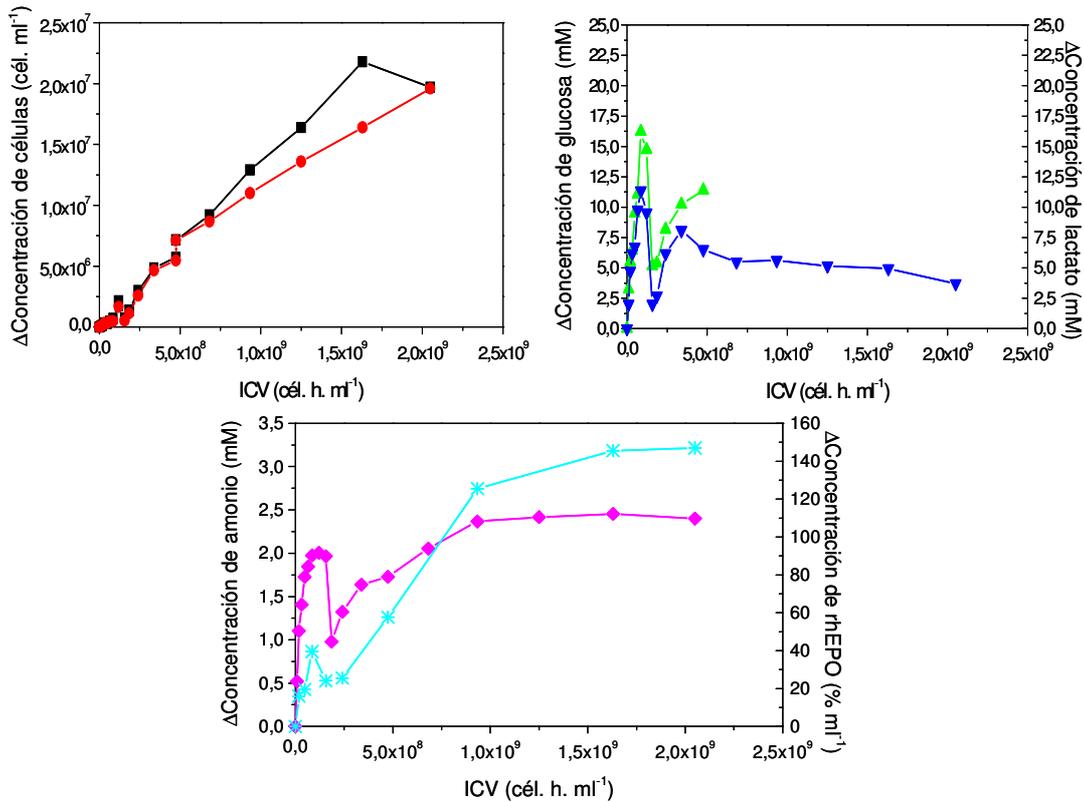


Fig. 68: Curvas metabólicas en función de la ICV obtenidas para el clon B1A2 cultivado en modo continuo con perfusión en un biorreactor de 5 l: (■) células totales; (●) células viables; (▲) glucosa; (▼) lactato; (◆) amonio y (✱) rhEPO.

Tabla LXXIX: Valores de μ , q_{glc} , q_{lac} , q_{glu} , q_{am} , q_{rhEPO} y de $Y_{lac/glc}$ obtenidos para las diferentes fases del cultivo del clon B1A2 en un biorreactor, en modo continuo con perfusión.

Parámetro	Fase A (0-6 días)	Fase B (6-8 días)	Fase C (8-12 días)	Fase D (12-17 días)
μ (h ⁻¹)	0,0061±0,0008 R=96 P=0,0006	nd ---- ----	0,018±0,002 R=97 P=0,001	0,0080±0,0001 R=99 P<0,0001
q_{glc} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	633±73 R=0,99 P<0,0001	-865±357 R=0,92 ----	114±21 R=0,95 P=0,012	Sin glc ---- ----
q_{lac} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	1,406±140 R=0,98 P=0,0002	-1,475±512 R=0,94 P=0,21	170±87 R=0,75 P=0,14	-17±3 R=0,94 P=0,005
q_{am} (nmol 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	22±4 R=0,92 P=0,0002	≈0 ---- ----	2,5±0,7 R=0,92 P=0,082	0,6±0,2 R=0,88 P=0,052
q_{rhEPO} (% 10 ⁻⁶ cél ⁻¹ h ⁻¹)	0,419±0,077 R=0,97 P=0,032	-0,216 R=1 P<0,0001	0,112±0,025 R=0,98 P=0,14	0,145±0,003 R=0,99 P=0,012
$Y_{lac/glc}$	2,22	1,71	1,49	----

La caída en la concentración de células se vio acompañada de una disminución en el consumo de glucosa y en la producción de lactato (evidenciándose en los valores de q_{glc} y q_{lac} de signo contrario a lo normalmente esperado), y en la producción de amonio, la cual se hizo prácticamente nula. La producción de rhEPO, por otro lado, también disminuyó, aunque en menor magnitud. A pesar de estas observaciones se decidió no modificar la velocidad de la perfusión del medio de cultivo, la cual se mantuvo constante hasta el final de la experiencia.

El cultivo se recuperó en el término de 24 h, verificándose el valor más alto de μ ($0,018\text{ h}^{-1}$) entre los días 8 y 12, durante el proceso de perfusión del medio Zell-C13. La maximización de la velocidad específica de crecimiento era uno de los objetivos planteados durante el proceso de optimización del medio de cultivo a ser utilizado durante la primera etapa del proceso (ver Capítulo 4). La rápida acumulación de células se hizo evidente también en la mayor pendiente de la curva de ICV durante esta fase.

Se inició luego la perfusión del medio Zell-C14, en lo que se consideró el inicio de la fase D: en este medio de cultivo con predominancia de manosa y asparagina, las células continuaron creciendo, si bien a una μ menor, hasta alcanzar en el día 17 la densidad celular máxima observada durante la experiencia (20×10^6 cél. viab. ml^{-1}).

Al observar la curva de concentración de células viables en la fase D fue posible inferir que las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas en el medio Zell-C14 cumplieron con el objetivo propuesto al aplicar ANN y la función D para el diseño de los medios de cultivo, al obtenerse una baja velocidad específica de crecimiento durante la etapa de producción. Una baja velocidad de crecimiento sería esencial para prolongar la vida de los cultivos, de acuerdo con los resultados presentados por Ramírez y Mutharasan (1990), ya que un metabolismo demasiado activo podría inducir la pérdida del balance neto de nutrientes (Xie y Wang, 1994) y/o la acumulación de metabolitos potencialmente tóxicos diferentes del lactato y el amonio (Fieder y col., 1995; Ryll y col., 1994).

La curva de concentración de lactato fue, como ya se ha reportado en otros trabajos, una imagen especular de la curva de glucosa, durante las fases del cultivo en que ésta se encontraba presente. La concentración de glucosa disminuyó drásticamente durante los primeros seis días del cultivo, observándose valores de q_{glc} entre 2 y 3 veces superiores a los obtenidos normalmente en experiencias anteriores. Durante la fase B, sin embargo, se verificó un leve aumento en su concentración, probablemente debido al efecto conjunto del aporte de glucosa a través de la perfusión, y un menor consumo ocasionado por la disminución registrada en la concentración de células. Una vez recuperado el cultivo (fase C), se observó nuevamente la utilización de este azúcar, asociada a la producción de

lactato. La concentración de este último se mantuvo relativamente constante durante la utilización del medio Zell-C14, sin glucosa, evidenciándose un leve consumo en este período.

La acumulación de lactato en el sobrenadante de cultivo durante los primeros días de cultivo así como el consumo de glucosa resultaron llamativamente altos, si se los correlaciona con el número de células presentes, destacando el efecto del sistema de cultivo sobre el metabolismo celular. Debido a que la oxigenación del cultivo era cuidadosamente controlada en el biorreactor, a través del sistema de aireación por membrana que respondía a la señal enviada por la sonda de oxígeno, la alta concentración de lactato no se debió a una activación del metabolismo anaeróbico de la glucosa, sino probablemente a condiciones de estrés hidrodinámico causado por el sistema de agitación del cultivo. El rendimiento de lactato a partir de glucosa para la fase A indicó una utilización extremadamente ineficiente del azúcar, el cual fue consumido a muy alta velocidad y destinado casi exclusivamente a la producción de este catabolito, lo cual concuerda con el desarrollo celular ocurrido en ese período de tiempo. Es posible que parte de la glutamina del medio fuera destinada también a la síntesis de lactato.

Entre los días 6 y 8 de cultivo, la disminución comprobada en el consumo de glucosa, correlacionada con la disminución en la producción de lactato, mostró una reducción del valor de $Y_{\text{glc/lac}}$, indicio del ajuste metabólico que se verificaría en la siguiente fase. El proceso de perfusión, al inducir un rápido aumento en la masa celular durante la fase C, resultó en una mejor regulación del metabolismo de la glucosa, recuperándose valores normales de q_{glc} y q_{lac} , y bajando así el valor de $Y_{\text{lac/glc}}$ a 1,49.

La producción de amonio durante la primera fase del cultivo, por otro lado, fue relativamente baja ($q_{\text{am}} = 22 \text{ nmol } 10^{-6} \text{ cél. h}^{-1}$), comparable a los valores obtenidos en experiencias anteriores en cultivos del clon B1A2 en frascos *spinner*, utilizando medios sin glutamina (ver Tabla LI, por ejemplo). Este resultado se debe probablemente a una serie de factores, entre lo que pueden mencionarse el contenido reducido de glutamina del medio, la presencia de glutamato como aceptor del grupo amino para la síntesis de glutamina (en lo que se conoce como *ciclo fútil*, ciclos de interconversión entre moléculas, cuyo único rendimiento neto es el consumo de ATP - para un análisis más detallado de estos ciclos referirse al trabajo de Wagner, 1997), y a la interrelación entre la glucólisis (altamente desregulada en esta fase del cultivo) y la glutaminólisis. La velocidad específica de producción de este ion disminuyó por debajo del valor de la velocidad de perfusión en la fase B, apareciendo por ello como aproximadamente nula en la Fig. 68. Luego de la disminución observada al inicio de la fase C volvió a incrementarse la concentración de este ion en el sobrenadante, aunque se redujo el valor de la pendiente de la curva de producción

cuando comenzó a utilizarse el medio Zell-C14, con asparagina y sin glutamina.

La curva de concentración de rhEPO acompañó el perfil de concentración de células viables a lo largo de todo el cultivo. Durante la fase A aquella se incrementó, para luego bajar cuando se inició la perfusión, debido a la disminución en la concentración de células y probablemente también al arrastre de la molécula ocasionado por la salida de sobrenadante de cultivo durante el proceso de perfusión. En la fase C la productividad fue recuperada, alcanzándose la concentración más alta de la proteína ($146 \% 10^{-6} \text{ cél. h}^{-1}$), durante la perfusión del medio Zell-C14.

Las muestras de los sobrenadantes de cultivo cosechas a tiempo $t=10$, 14 y 16 días fueron concentradas por ultracentrifugación, cuantificadas por ELISA y sometidas a IEF seguido de *Western blot* y densitometría de bandas con el fin de determinar el perfil de isoformas de rhEPO producidas en cada una de las condiciones evaluadas. En este ensayo se analizó paralelamente una muestra de rhEPO purificada por cromatografía de afinidad a colorante, como estándar. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla LXXX. Posteriormente se procedió a recalcular la proporción relativa de cada isoforma considerando únicamente las isoformas 1 a 8, de manera análoga a la descrita en la Sección 5, obteniéndose a partir de estos datos los valores de AB_t calculados de acuerdo con la Ec. (30).

Tabla LXXX: Proporción relativa de las isoformas de rhEPO producidas por el clon B1A2 cultivado en modo continuo con perfusión en un biorreactor de 5 l, utilizando los medios de cultivo Zell-C13 y Zell-C14, y actividad biológica teórica calculada para cada muestra.

Isoforma	Sn t=10d (Zell-C13)	Sn t=14d (Zell-C14)	Sn t=16d (Zell-C14)
-3	2,6%	11,8%	16,6%
-2	2,8%	7,4%	8,3%
-1	3,4%	12,2%	9,5%
0	11,5%	15,2%	9,6%
1	10,7%	8,3%	8,3%
2	15,2%	8,2%	13,3%
3	11,7%	8,2%	7,7%
4	13,2%	8,1%	7,5%
5	13,0%	9,4%	7,1%
6	9,2%	7,0%	9,0%
7	6,1%	3,7%	2,3%
8	1,6%	0,7%	0,7%
AB_t	72.900 UI mg⁻¹	74.300 UI mg⁻¹	65.100 UI mg⁻¹

La distribución de isoformas observada confirma que los medios diseñados favorecen la síntesis de glicoformas con alto contenido de ácido siálico. La actividad biológica de la rhEPO, calculada para las muestras de $t=10$ d (medio Zell-C13) y $t=14$ d (medio Zell-C14) fue superior a cualquier valor empírico obtenido previamente en los experimentos de mezclas cruzadas (presentados en la Tabla LXI), lo que representa un resultado altamente positivo. Paralelamente, la AB_7 estimada para la muestra semi-purificada del sobrenadante de cultivo correspondiente al día 16 también fue muy alta ($65.100 \text{ UI mg}^{-1}$); si se la compara con los resultados experimentales de la Tabla LXI se observa que este valor sólo fue superado en una ocasión.

Resulta llamativa la variación observada entre los resultados de día 14 y día 16, utilizando el mismo medio de cultivo, lo que indica que otros factores diferentes de la composición del medio estarían influenciando la glicosilación de la molécula. No puede incluirse entre ellos a la osmolalidad, la cual se mantuvo aproximadamente constante durante todo el cultivo, aunque sí sería factible que se hubiera verificado la influencia de la acumulación de amonio: hasta el día 14 su concentración se incrementó progresivamente, alcanzando en ese día el valor de $\approx 3 \text{ mM}$, para luego mantenerse relativamente constante hasta el día 16, cuando se obtuvo la mayor densidad celular del cultivo.

Los resultados hasta aquí presentados demuestran que no sólo es factible aplicar herramientas de quimiometría en la optimización de procesos biológicos, sino que además éstas permiten llevar adelante un análisis racional, efectivo y eficiente que redundará en la mejora de los sistemas productivos, aún aquéllos tan complejos como la producción de biofármacos en cultivo de células de mamífero.

8.5. CONCLUSIONES

- Mediante la perfusión se logró extender la vida del cultivo, en comparación con el cultivo en modo *batch*, y consecuentemente la duración del proceso productivo, lo que resulta en una mejora sustancial desde el punto de vista tecnológico.
- La utilización de un sistema de cultivo en perfusión permitió obtener además concentraciones celulares 10 a 20 veces superiores a las obtenidas en cultivos en modo *batch*.
- En el cultivo en biorreactor sin perfusión (fase A) se verificó una alta desregulación del metabolismo de la glucosa, observándose valores muy altos de q_{glc} y q_{lac} , probablemente debido al estrés hidrodinámico al que eran sometidas las células.

-
- El cultivo en perfusión permitió la adaptación del metabolismo celular hacia una glicólisis más eficiente, recuperándose valores normales de q_{glc} y q_{lac} , y obteniéndose una mayor producción de masa celular.
 - El valor máximo de μ obtenido durante el cultivo del clon B1A2 en el biorreactor se obtuvo con la utilización del medio Zell-C13, tal como había sido requerido durante el proceso de optimización de medios de cultivo mediante al análisis por ANN.
 - La velocidad específica de crecimiento fue menor en el medio Zell-C14, condición requerida durante la generación de la función deseabilidad global D para la formulación del medio a ser utilizado durante la etapa de producción del cultivo.
 - La concentración máxima de rhEPO se obtuvo durante la perfusión del medio Zell-C14, utilizado durante la etapa de producción del proceso.
 - El empleo del medio Zell-C14, con mayor contenido de asparagina, redundó en una menor velocidad específica de amonio, lo cual se considera beneficioso para el proceso productivo.
 - La actividad biológica específica estimada para la rhEPO producida al utilizar los medios de cultivo Zell-C13 y Zell-C14 fue muy alta, siendo superior a los valores obtenidos previamente, lo que constituía el objetivo principal del proceso de optimización del medio de cultivo diseñado para el clon B1A2.

9-CONCLUSIONES GENERALES

9. CONCLUSIONES GENERALES

Con referencia a los objetivos propuestos para este trabajo de tesis, se concluye que:

1. Se obtuvieron nuevos clones productores de rhEPO, los cuales fueron adaptados al crecimiento en suspensión en medios de cultivo reducidos en suero y medios de cultivo libres de proteínas. En particular, se seleccionó el clon B1A2 como nuevo clon productor de rhEPO, ya que éste presentaba características apropiadas de crecimiento y productividad, así como un satisfactorio perfil glicosídico de la molécula producida, que lo hacen apto para su uso en la producción a gran escala de esta hormona.
2. Se determinó el efecto de la adición al medio de cultivo de los aminoazúcares N-acetilglucosamina y N-acetilmanosamina, y del ion NH_4^+ sobre el crecimiento, productividad y perfil de glicofomas de rhEPO producidas por el clon productor B1A2. En presencia de GlcNAc y de amonio, aún en concentraciones tan bajas como para no afectar el crecimiento celular, se observó una disminución de las isoformas de mayor actividad biológica específica. Fue posible así establecer el grado de sensibilidad del clon productor con respecto al amonio. Concentraciones de amonio mayores que 1,5 mM afectan la glicosilación de la molécula.
3. Se determinó el efecto que tiene la osmolalidad del medio de cultivo sobre el crecimiento, productividad y perfil de glicofomas de rhEPO producidas por el clon productor B1A2. Se comprobó que la actividad biológica específica de la rhEPO producida varía en forma inversamente proporcional a la osmolalidad del medio, por lo que el control de esta variable en el medio de cultivo resulta crítico para la obtención de una molécula de rhEPO de alta calidad glicosídica. Paralelamente se verificó la necesidad de utilizar fuentes de carbono rápidamente metabolizables, como la glucosa, cuando se emplean medios hipoosmolales para el cultivo.
4. Se estudió el efecto del uso de diferentes fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento, productividad y perfil de glicofomas de rhEPO producidas por el clon productor seleccionado, verificándose que el clon B1A2 es capaz de crecer satisfactoriamente cuando se utilizan manosa y asparagina como especies mayoritarias en el medio, en tanto no ocurre lo mismo cuando se emplean

galactosa y glutamato como sustitutos de la glucosa y la glutamina, respectivamente.

5. Mediante el empleo de técnicas del diseño de experimentos y herramientas quimiométricas se diseñaron dos medios de cultivo libres de proteínas que permitieron obtener una molécula de rhEPO de muy alta calidad glicosídica, durante el cultivo del clon B1A2 en un reactor de agitación, empleando un modo de cultivo continuo bifásico con perfusión.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis han ampliado el conocimiento sobre el metabolismo de la línea celular CHO, así como de los factores que influyen en el proceso de glicosilación de la molécula de rhEPO producida, habiéndose utilizado con este fin metodologías analíticas novedosas en esta área, lo cual constituye una mejora significativa, que puede ser aplicada directamente a la producción industrial de esta proteína recombinante de creciente potencial terapéutico.

10-ANEXOS

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1: ANOVA DE UNA VÍA PARA LA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS.

Tratamiento	N	Perdidos	Media	Desviación Estándar	Error Estándar de la Media
180 mM	2	0	79.380,0	3.225,821	2.281,0
150 mM	2	0	87.085,0	7.297,342	5.160,0
120 mM	2	0	92.699,5	2.721,654	1.924,5
100 mM	2	0	93.400,5	1.644,023	1.162,5
90 mM	2	1	94.818,0	0,000	0,0
80 mM	2	0	93.070,0	4.360,020	3.083,0
60 mM	2	0	105.005,0	278,600	197,0

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Suma de cuadrados medios	F	P
Entre tratamientos	5	711.677.967,667	142.335.593,533	9,197	0,009
Residuo	6	92.854.731,000	15.475.788,500		
Total	11	804.532.698,667			

10.2. ANEXO 2: COMPARACIONES PAREADAS ENTRE MEDIAS DE DIFERENTES TRATAMIENTOS POR EL MÉTODO DE MÍNIMA DIFERENCIA DE CUADRADOS (LEAST SQUARE DIFFERENCE, LSD).

Comparación	Diferencia entre las medias	p	q	P<0,05
60 mM vs 180 mM	25.625,000	7,000	6,514	SÍ
60 mM vs 150 mM	17.929,000	7,000	4,555	SÍ
60 mM vs 120 mM	12.305,500	7,000	3,128	SÍ
60 mM vs 80 mM	11.935,000	7,000	3,034	SÍ
60 mM vs 100 mM	11.604,500	7,000	2,950	SÍ
60 mM vs 90 mM	10.187,000	7,000	2,114	NO
90 mM vs 180 mM	15.438,000	7,000	3,204	SÍ
90 mM vs 150 mM	7.733,000	7,000	1,605	NO
90 mM vs 120 mM	2.118,500	7,000	0,440	NO
90 mM vs 80 mM	1.748,000	7,000	0,363	NO
90 mM vs 100 mM	1.417,500	7,000	0,294	NO
100 mM vs 180 mM	14.020,500	7,000	3,564	SÍ
100 mM vs 150 mM	6.315,500	7,000	1,605	NO
100 mM vs 120 mM	701,000	7,000	0,178	NO
100 mM vs 80 mM	330,500	7,000	0,084	NO
80 mM vs 180 mM	13.690,000	7,000	3,480	SÍ
80 mM vs 150 mM	5.985,000	7,000	1,521	NO
80 mM vs 120 mM	370,500	7,000	0,094	NO
120 mM vs 180 mM	13.319,500	7,000	3,386	SÍ
120 mM vs 150 mM	5.614,500	7,000	1,427	NO
120 mM vs 180 mM	7.705,000	7,000	1,959	NO

10.3. ANEXO 3: COMPOSICIÓN (EXPRESADA EN mM) DE LAS 800 MEZCLAS DEL CONJUNTO DE PRUEBA UTILIZADO EN EL ENTRENAMIENTO DE LAS REDES NEURONALES ARTIFICIALES.

Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn	Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn
1	0,00	12,50	12,50	0,000	0,000	5,100	61	0,00	25,00	0,00	0,667	3,589	0,844
2	0,00	12,50	12,50	2,667	0,367	2,067	62	0,00	25,00	0,00	3,400	1,033	0,667
3	0,00	12,50	12,50	4,000	0,367	0,733	63	0,00	25,00	0,00	2,267	1,500	1,333
4	0,00	12,50	12,50	4,000	0,400	0,700	64	0,00	25,00	0,00	2,267	1,333	1,500
5	0,00	12,50	12,50	1,000	0,775	3,325	65	12,50	12,50	0,00	0,000	0,000	5,100
6	0,00	12,50	12,50	2,000	0,775	2,325	66	12,50	12,50	0,00	2,667	0,367	2,067
7	0,00	12,50	12,50	3,000	0,775	1,325	67	12,50	12,50	0,00	4,000	0,367	0,733
8	0,00	12,50	12,50	3,000	1,050	1,050	68	12,50	12,50	0,00	4,000	0,400	0,700
9	0,00	12,50	12,50	3,000	1,325	0,775	69	12,50	12,50	0,00	1,000	0,775	3,325
10	0,00	12,50	12,50	2,000	1,550	1,550	70	12,50	12,50	0,00	2,000	0,775	2,325
11	0,00	12,50	12,50	0,000	1,700	3,400	71	12,50	12,50	0,00	3,000	0,775	1,325
12	0,00	12,50	12,50	1,333	1,700	2,067	72	12,50	12,50	0,00	3,000	1,050	1,050
13	0,00	12,50	12,50	1,000	2,050	2,050	73	12,50	12,50	0,00	3,000	1,325	0,775
14	0,00	12,50	12,50	1,333	2,067	1,700	74	12,50	12,50	0,00	2,000	1,550	1,550
15	0,00	12,50	12,50	2,667	2,067	0,367	75	12,50	12,50	0,00	0,000	1,700	3,400
16	0,00	12,50	12,50	2,000	2,325	0,775	76	12,50	12,50	0,00	1,333	1,700	2,067
17	0,00	12,50	12,50	0,000	2,550	2,550	77	12,50	12,50	0,00	1,000	2,050	2,050
18	0,00	12,50	12,50	1,000	3,325	0,775	78	12,50	12,50	0,00	1,333	2,067	1,700
19	0,00	12,50	12,50	0,000	3,400	1,700	79	12,50	12,50	0,00	2,667	2,067	0,367
20	0,00	12,50	12,50	0,000	5,100	0,000	80	12,50	12,50	0,00	2,000	2,325	0,775
21	0,00	12,50	12,50	0,850	3,967	0,283	81	12,50	12,50	0,00	0,000	2,550	2,550
22	0,00	12,50	12,50	0,850	0,283	3,967	82	12,50	12,50	0,00	1,000	3,325	0,775
23	0,00	12,50	12,50	0,000	3,967	1,133	83	12,50	12,50	0,00	0,000	3,400	1,700
24	0,00	12,50	12,50	0,000	1,133	3,967	84	12,50	12,50	0,00	0,000	5,100	0,000
25	0,00	12,50	12,50	1,417	2,550	1,133	85	12,50	12,50	0,00	0,850	3,967	0,283
26	0,00	12,50	12,50	1,417	1,133	2,550	86	12,50	12,50	0,00	0,850	0,283	3,967
27	0,00	12,50	12,50	0,567	2,863	1,670	87	12,50	12,50	0,00	0,000	3,967	1,133
28	0,00	12,50	12,50	0,567	1,670	2,863	88	12,50	12,50	0,00	0,000	1,133	3,967
29	0,00	12,50	12,50	0,667	3,589	0,844	89	12,50	12,50	0,00	1,417	2,550	1,133
30	0,00	12,50	12,50	3,400	1,033	0,667	90	12,50	12,50	0,00	1,417	1,133	2,550
31	0,00	12,50	12,50	2,267	1,500	1,333	91	12,50	12,50	0,00	0,567	2,863	1,670
32	0,00	12,50	12,50	2,267	1,333	1,500	92	12,50	12,50	0,00	0,567	1,670	2,863
33	0,00	25,00	0,00	0,000	0,000	5,100	93	12,50	12,50	0,00	0,667	3,589	0,844
34	0,00	25,00	0,00	2,667	0,367	2,067	94	12,50	12,50	0,00	3,400	1,033	0,667
35	0,00	25,00	0,00	4,000	0,367	0,733	95	12,50	12,50	0,00	2,267	1,500	1,333
36	0,00	25,00	0,00	4,000	0,400	0,700	96	12,50	12,50	0,00	2,267	1,333	1,500
37	0,00	25,00	0,00	1,000	0,775	3,325	97	4,17	4,17	16,67	0,000	0,000	5,100
38	0,00	25,00	0,00	2,000	0,775	2,325	98	4,17	4,17	16,67	2,667	0,367	2,067
39	0,00	25,00	0,00	3,000	0,775	1,325	99	4,17	4,17	16,67	4,000	0,367	0,733
40	0,00	25,00	0,00	3,000	1,050	1,050	100	4,17	4,17	16,67	4,000	0,400	0,700
41	0,00	25,00	0,00	3,000	1,325	0,775	101	4,17	4,17	16,67	1,000	0,775	3,325
42	0,00	25,00	0,00	2,000	1,550	1,550	102	4,17	4,17	16,67	2,000	0,775	2,325
43	0,00	25,00	0,00	0,000	1,700	3,400	103	4,17	4,17	16,67	3,000	0,775	1,325
44	0,00	25,00	0,00	1,333	1,700	2,067	104	4,17	4,17	16,67	3,000	1,050	1,050
45	0,00	25,00	0,00	1,000	2,050	2,050	105	4,17	4,17	16,67	3,000	1,325	0,775
46	0,00	25,00	0,00	1,333	2,067	1,700	106	4,17	4,17	16,67	2,000	1,550	1,550
47	0,00	25,00	0,00	2,667	2,067	0,367	107	4,17	4,17	16,67	0,000	1,700	3,400
48	0,00	25,00	0,00	2,000	2,325	0,775	108	4,17	4,17	16,67	1,333	1,700	2,067
49	0,00	25,00	0,00	0,000	2,550	2,550	109	4,17	4,17	16,67	1,000	2,050	2,050
50	0,00	25,00	0,00	1,000	3,325	0,775	110	4,17	4,17	16,67	1,333	2,067	1,700
51	0,00	25,00	0,00	0,000	3,400	1,700	111	4,17	4,17	16,67	2,667	2,067	0,367
52	0,00	25,00	0,00	0,000	5,100	0,000	112	4,17	4,17	16,67	2,000	2,325	0,775
53	0,00	25,00	0,00	0,850	3,967	0,283	113	4,17	4,17	16,67	0,000	2,550	2,550
54	0,00	25,00	0,00	0,850	0,283	3,967	114	4,17	4,17	16,67	1,000	3,325	0,775
55	0,00	25,00	0,00	0,000	3,967	1,133	115	4,17	4,17	16,67	0,000	3,400	1,700
56	0,00	25,00	0,00	0,000	1,133	3,967	116	4,17	4,17	16,67	0,000	5,100	0,000
57	0,00	25,00	0,00	1,417	2,550	1,133	117	4,17	4,17	16,67	0,850	3,967	0,283
58	0,00	25,00	0,00	1,417	1,133	2,550	118	4,17	4,17	16,67	0,850	0,283	3,967
59	0,00	25,00	0,00	0,567	2,863	1,670	119	4,17	4,17	16,67	0,000	3,967	1,133
60	0,00	25,00	0,00	0,567	1,670	2,863	120	4,17	4,17	16,67	0,000	1,133	3,967

Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn	Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn
121	4,17	4,17	16,67	1,417	2,550	1,133	181	16,67	4,17	4,17	0,850	3,967	0,283
122	4,17	4,17	16,67	1,417	1,133	2,550	182	16,67	4,17	4,17	0,850	0,283	3,967
123	4,17	4,17	16,67	0,567	2,863	1,670	183	16,67	4,17	4,17	0,000	3,967	1,133
124	4,17	4,17	16,67	0,567	1,670	2,863	184	16,67	4,17	4,17	0,000	1,133	3,967
125	4,17	4,17	16,67	0,667	3,589	0,844	185	16,67	4,17	4,17	1,417	2,550	1,133
126	4,17	4,17	16,67	3,400	1,033	0,667	186	16,67	4,17	4,17	1,417	1,133	2,550
127	4,17	4,17	16,67	2,267	1,500	1,333	187	16,67	4,17	4,17	0,567	2,863	1,670
128	4,17	4,17	16,67	2,267	1,333	1,500	188	16,67	4,17	4,17	0,567	1,670	2,863
129	4,17	16,67	4,17	0,000	0,000	5,100	189	16,67	4,17	4,17	0,667	3,589	0,844
130	4,17	16,67	4,17	2,667	0,367	2,067	190	16,67	4,17	4,17	3,400	1,033	0,667
131	4,17	16,67	4,17	4,000	0,367	0,733	191	16,67	4,17	4,17	2,267	1,500	1,333
132	4,17	16,67	4,17	4,000	0,400	0,700	192	16,67	4,17	4,17	2,267	1,333	1,500
133	4,17	16,67	4,17	1,000	0,775	3,325	193	8,33	8,33	8,33	0,000	0,000	5,100
134	4,17	16,67	4,17	2,000	0,775	2,325	194	8,33	8,33	8,33	2,667	0,367	2,067
135	4,17	16,67	4,17	3,000	0,775	1,325	195	8,33	8,33	8,33	4,000	0,367	0,733
136	4,17	16,67	4,17	3,000	1,050	1,050	196	8,33	8,33	8,33	4,000	0,400	0,700
137	4,17	16,67	4,17	3,000	1,325	0,775	197	8,33	8,33	8,33	1,000	0,775	3,325
138	4,17	16,67	4,17	2,000	1,550	1,550	198	8,33	8,33	8,33	2,000	0,775	2,325
139	4,17	16,67	4,17	0,000	1,700	3,400	199	8,33	8,33	8,33	3,000	0,775	1,325
140	4,17	16,67	4,17	1,333	1,700	2,067	200	8,33	8,33	8,33	3,000	1,050	1,050
141	4,17	16,67	4,17	1,000	2,050	2,050	201	8,33	8,33	8,33	3,000	1,325	0,775
142	4,17	16,67	4,17	1,333	2,067	1,700	202	8,33	8,33	8,33	2,000	1,550	1,550
143	4,17	16,67	4,17	2,667	2,067	0,367	203	8,33	8,33	8,33	0,000	1,700	3,400
144	4,17	16,67	4,17	2,000	2,325	0,775	204	8,33	8,33	8,33	1,333	1,700	2,067
145	4,17	16,67	4,17	0,000	2,550	2,550	205	8,33	8,33	8,33	1,000	2,050	2,050
146	4,17	16,67	4,17	1,000	3,325	0,775	206	8,33	8,33	8,33	1,333	2,067	1,700
147	4,17	16,67	4,17	0,000	3,400	1,700	207	8,33	8,33	8,33	2,667	2,067	0,367
148	4,17	16,67	4,17	0,000	5,100	0,000	208	8,33	8,33	8,33	2,000	2,325	0,775
149	4,17	16,67	4,17	0,850	3,967	0,283	209	8,33	8,33	8,33	0,000	2,550	2,550
150	4,17	16,67	4,17	0,850	0,283	3,967	210	8,33	8,33	8,33	1,000	3,325	0,775
151	4,17	16,67	4,17	0,000	3,967	1,133	211	8,33	8,33	8,33	0,000	3,400	1,700
152	4,17	16,67	4,17	0,000	1,133	3,967	212	8,33	8,33	8,33	0,000	5,100	0,000
153	4,17	16,67	4,17	1,417	2,550	1,133	213	8,33	8,33	8,33	0,850	3,967	0,283
154	4,17	16,67	4,17	1,417	1,133	2,550	214	8,33	8,33	8,33	0,850	0,283	3,967
155	4,17	16,67	4,17	0,567	2,863	1,670	215	8,33	8,33	8,33	0,000	3,967	1,133
156	4,17	16,67	4,17	0,567	1,670	2,863	216	8,33	8,33	8,33	0,000	1,133	3,967
157	4,17	16,67	4,17	0,667	3,589	0,844	217	8,33	8,33	8,33	1,417	2,550	1,133
158	4,17	16,67	4,17	3,400	1,033	0,667	218	8,33	8,33	8,33	1,417	1,133	2,550
159	4,17	16,67	4,17	2,267	1,500	1,333	219	8,33	8,33	8,33	0,567	2,863	1,670
160	4,17	16,67	4,17	2,267	1,333	1,500	220	8,33	8,33	8,33	0,567	1,670	2,863
161	16,67	4,17	4,17	0,000	0,000	5,100	221	8,33	8,33	8,33	0,667	3,589	0,844
162	16,67	4,17	4,17	2,667	0,367	2,067	222	8,33	8,33	8,33	3,400	1,033	0,667
163	16,67	4,17	4,17	4,000	0,367	0,733	223	8,33	8,33	8,33	2,267	1,500	1,333
164	16,67	4,17	4,17	4,000	0,400	0,700	224	8,33	8,33	8,33	2,267	1,333	1,500
165	16,67	4,17	4,17	1,000	0,775	3,325	225	12,50	0,00	12,50	0,000	0,000	5,100
166	16,67	4,17	4,17	2,000	0,775	2,325	226	12,50	0,00	12,50	2,667	0,367	2,067
167	16,67	4,17	4,17	3,000	0,775	1,325	227	12,50	0,00	12,50	4,000	0,367	0,733
168	16,67	4,17	4,17	3,000	1,050	1,050	228	12,50	0,00	12,50	4,000	0,400	0,700
169	16,67	4,17	4,17	3,000	1,325	0,775	229	12,50	0,00	12,50	1,000	0,775	3,325
170	16,67	4,17	4,17	2,000	1,550	1,550	230	12,50	0,00	12,50	2,000	0,775	2,325
171	16,67	4,17	4,17	0,000	1,700	3,400	231	12,50	0,00	12,50	3,000	0,775	1,325
172	16,67	4,17	4,17	1,333	1,700	2,067	232	12,50	0,00	12,50	3,000	1,050	1,050
173	16,67	4,17	4,17	1,000	2,050	2,050	233	12,50	0,00	12,50	3,000	1,325	0,775
174	16,67	4,17	4,17	1,333	2,067	1,700	234	12,50	0,00	12,50	2,000	1,550	1,550
175	16,67	4,17	4,17	2,667	2,067	0,367	235	12,50	0,00	12,50	0,000	1,700	3,400
176	16,67	4,17	4,17	2,000	2,325	0,775	236	12,50	0,00	12,50	1,333	1,700	2,067
177	16,67	4,17	4,17	0,000	2,550	2,550	237	12,50	0,00	12,50	1,000	2,050	2,050
178	16,67	4,17	4,17	1,000	3,325	0,775	238	12,50	0,00	12,50	1,333	2,067	1,700
179	16,67	4,17	4,17	0,000	3,400	1,700	239	12,50	0,00	12,50	2,667	2,067	0,367
180	16,67	4,17	4,17	0,000	5,100	0,000	240	12,50	0,00	12,50	2,000	2,325	0,775

Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn	Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn
241	12,50	0,00	12,50	0,000	2,550	2,550	301	25,00	0,00	0,00	1,000	2,050	2,050
242	12,50	0,00	12,50	1,000	3,325	0,775	302	25,00	0,00	0,00	1,333	2,067	1,700
243	12,50	0,00	12,50	0,000	3,400	1,700	303	25,00	0,00	0,00	2,667	2,067	0,367
244	12,50	0,00	12,50	0,000	5,100	0,000	304	25,00	0,00	0,00	2,000	2,325	0,775
245	12,50	0,00	12,50	0,850	3,967	0,283	305	25,00	0,00	0,00	0,000	2,550	2,550
246	12,50	0,00	12,50	0,850	0,283	3,967	306	25,00	0,00	0,00	1,000	3,325	0,775
247	12,50	0,00	12,50	0,000	3,967	1,133	307	25,00	0,00	0,00	0,000	3,400	1,700
248	12,50	0,00	12,50	0,000	1,133	3,967	308	25,00	0,00	0,00	0,000	5,100	0,000
249	12,50	0,00	12,50	1,417	2,550	1,133	309	25,00	0,00	0,00	0,850	3,967	0,283
250	12,50	0,00	12,50	1,417	1,133	2,550	310	25,00	0,00	0,00	0,850	0,283	3,967
251	12,50	0,00	12,50	0,567	2,863	1,670	311	25,00	0,00	0,00	0,000	3,967	1,133
252	12,50	0,00	12,50	0,567	1,670	2,863	312	25,00	0,00	0,00	0,000	1,133	3,967
253	12,50	0,00	12,50	0,667	3,589	0,844	313	25,00	0,00	0,00	1,417	2,550	1,133
254	12,50	0,00	12,50	3,400	1,033	0,667	314	25,00	0,00	0,00	1,417	1,133	2,550
255	12,50	0,00	12,50	2,267	1,500	1,333	315	25,00	0,00	0,00	0,567	2,863	1,670
256	12,50	0,00	12,50	2,267	1,333	1,500	316	25,00	0,00	0,00	0,567	1,670	2,863
257	0,00	0,00	25,00	0,000	0,000	5,100	317	25,00	0,00	0,00	0,667	3,589	0,844
258	0,00	0,00	25,00	2,667	0,367	2,067	318	25,00	0,00	0,00	3,400	1,033	0,667
259	0,00	0,00	25,00	4,000	0,367	0,733	319	25,00	0,00	0,00	2,267	1,500	1,333
260	0,00	0,00	25,00	4,000	0,400	0,700	320	25,00	0,00	0,00	2,267	1,333	1,500
261	0,00	0,00	25,00	1,000	0,775	3,325	321	20,33	2,33	2,33	0,000	0,000	5,100
262	0,00	0,00	25,00	2,000	0,775	2,325	322	20,33	2,33	2,33	2,667	0,367	2,067
263	0,00	0,00	25,00	3,000	0,775	1,325	323	20,33	2,33	2,33	4,000	0,367	0,733
264	0,00	0,00	25,00	3,000	1,050	1,050	324	20,33	2,33	2,33	4,000	0,400	0,700
265	0,00	0,00	25,00	3,000	1,325	0,775	325	20,33	2,33	2,33	1,000	0,775	3,325
266	0,00	0,00	25,00	2,000	1,550	1,550	326	20,33	2,33	2,33	2,000	0,775	2,325
267	0,00	0,00	25,00	0,000	1,700	3,400	327	20,33	2,33	2,33	3,000	0,775	1,325
268	0,00	0,00	25,00	1,333	1,700	2,067	328	20,33	2,33	2,33	3,000	1,050	1,050
269	0,00	0,00	25,00	1,000	2,050	2,050	329	20,33	2,33	2,33	3,000	1,325	0,775
270	0,00	0,00	25,00	1,333	2,067	1,700	330	20,33	2,33	2,33	2,000	1,550	1,550
271	0,00	0,00	25,00	2,667	2,067	0,367	331	20,33	2,33	2,33	0,000	1,700	3,400
272	0,00	0,00	25,00	2,000	2,325	0,775	332	20,33	2,33	2,33	1,333	1,700	2,067
273	0,00	0,00	25,00	0,000	2,550	2,550	333	20,33	2,33	2,33	1,000	2,050	2,050
274	0,00	0,00	25,00	1,000	3,325	0,775	334	20,33	2,33	2,33	1,333	2,067	1,700
275	0,00	0,00	25,00	0,000	3,400	1,700	335	20,33	2,33	2,33	2,667	2,067	0,367
276	0,00	0,00	25,00	0,000	5,100	0,000	336	20,33	2,33	2,33	2,000	2,325	0,775
277	0,00	0,00	25,00	0,850	3,967	0,283	337	20,33	2,33	2,33	0,000	2,550	2,550
278	0,00	0,00	25,00	0,850	0,283	3,967	338	20,33	2,33	2,33	1,000	3,325	0,775
279	0,00	0,00	25,00	0,000	3,967	1,133	339	20,33	2,33	2,33	0,000	3,400	1,700
280	0,00	0,00	25,00	0,000	1,133	3,967	340	20,33	2,33	2,33	0,000	5,100	0,000
281	0,00	0,00	25,00	1,417	2,550	1,133	341	20,33	2,33	2,33	0,850	3,967	0,283
282	0,00	0,00	25,00	1,417	1,133	2,550	342	20,33	2,33	2,33	0,850	0,283	3,967
283	0,00	0,00	25,00	0,567	2,863	1,670	343	20,33	2,33	2,33	0,000	3,967	1,133
284	0,00	0,00	25,00	0,567	1,670	2,863	344	20,33	2,33	2,33	0,000	1,133	3,967
285	0,00	0,00	25,00	0,667	3,589	0,844	345	20,33	2,33	2,33	1,417	2,550	1,133
286	0,00	0,00	25,00	3,400	1,033	0,667	346	20,33	2,33	2,33	1,417	1,133	2,550
287	0,00	0,00	25,00	2,267	1,500	1,333	347	20,33	2,33	2,33	0,567	2,863	1,670
288	0,00	0,00	25,00	2,267	1,333	1,500	348	20,33	2,33	2,33	0,567	1,670	2,863
289	25,00	0,00	0,00	0,000	0,000	5,100	349	20,33	2,33	2,33	0,667	3,589	0,844
290	25,00	0,00	0,00	2,667	0,367	2,067	350	20,33	2,33	2,33	3,400	1,033	0,667
291	25,00	0,00	0,00	4,000	0,367	0,733	351	20,33	2,33	2,33	2,267	1,500	1,333
292	25,00	0,00	0,00	4,000	0,400	0,700	352	20,33	2,33	2,33	2,267	1,333	1,500
293	25,00	0,00	0,00	1,000	0,775	3,325	353	2,33	20,33	2,33	0,000	0,000	5,100
294	25,00	0,00	0,00	2,000	0,775	2,325	354	2,33	20,33	2,33	2,667	0,367	2,067
295	25,00	0,00	0,00	3,000	0,775	1,325	355	2,33	20,33	2,33	4,000	0,367	0,733
296	25,00	0,00	0,00	3,000	1,050	1,050	356	2,33	20,33	2,33	4,000	0,400	0,700
297	25,00	0,00	0,00	3,000	1,325	0,775	357	2,33	20,33	2,33	1,000	0,775	3,325
298	25,00	0,00	0,00	2,000	1,550	1,550	358	2,33	20,33	2,33	2,000	0,775	2,325
299	25,00	0,00	0,00	0,000	1,700	3,400	359	2,33	20,33	2,33	3,000	0,775	1,325
300	25,00	0,00	0,00	1,333	1,700	2,067	360	2,33	20,33	2,33	3,000	1,050	1,050

Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn	Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn
361	2,33	20,33	2,33	3,000	1,325	0,775	421	18,75	6,25	0,00	1,000	0,775	3,325
362	2,33	20,33	2,33	2,000	1,550	1,550	422	18,75	6,25	0,00	2,000	0,775	2,325
363	2,33	20,33	2,33	0,000	1,700	3,400	423	18,75	6,25	0,00	3,000	0,775	1,325
364	2,33	20,33	2,33	1,333	1,700	2,067	424	18,75	6,25	0,00	3,000	1,050	1,050
365	2,33	20,33	2,33	1,000	2,050	2,050	425	18,75	6,25	0,00	3,000	1,325	0,775
366	2,33	20,33	2,33	1,333	2,067	1,700	426	18,75	6,25	0,00	2,000	1,550	1,550
367	2,33	20,33	2,33	2,667	2,067	0,367	427	18,75	6,25	0,00	0,000	1,700	3,400
368	2,33	20,33	2,33	2,000	2,325	0,775	428	18,75	6,25	0,00	1,333	1,700	2,067
369	2,33	20,33	2,33	0,000	2,550	2,550	429	18,75	6,25	0,00	1,000	2,050	2,050
370	2,33	20,33	2,33	1,000	3,325	0,775	430	18,75	6,25	0,00	1,333	2,067	1,700
371	2,33	20,33	2,33	0,000	3,400	1,700	431	18,75	6,25	0,00	2,667	2,067	0,367
372	2,33	20,33	2,33	0,000	5,100	0,000	432	18,75	6,25	0,00	2,000	2,325	0,775
373	2,33	20,33	2,33	0,850	3,967	0,283	433	18,75	6,25	0,00	0,000	2,550	2,550
374	2,33	20,33	2,33	0,850	0,283	3,967	434	18,75	6,25	0,00	1,000	3,325	0,775
375	2,33	20,33	2,33	0,000	3,967	1,133	435	18,75	6,25	0,00	0,000	3,400	1,700
376	2,33	20,33	2,33	0,000	1,133	3,967	436	18,75	6,25	0,00	0,000	5,100	0,000
377	2,33	20,33	2,33	1,417	2,550	1,133	437	18,75	6,25	0,00	0,850	3,967	0,283
378	2,33	20,33	2,33	1,417	1,133	2,550	438	18,75	6,25	0,00	0,850	0,283	3,967
379	2,33	20,33	2,33	0,567	2,863	1,670	439	18,75	6,25	0,00	0,000	3,967	1,133
380	2,33	20,33	2,33	0,567	1,670	2,863	440	18,75	6,25	0,00	0,000	1,133	3,967
381	2,33	20,33	2,33	0,667	3,589	0,844	441	18,75	6,25	0,00	1,417	2,550	1,133
382	2,33	20,33	2,33	3,400	1,033	0,667	442	18,75	6,25	0,00	1,417	1,133	2,550
383	2,33	20,33	2,33	2,267	1,500	1,333	443	18,75	6,25	0,00	0,567	2,863	1,670
384	2,33	20,33	2,33	2,267	1,333	1,500	444	18,75	6,25	0,00	0,567	1,670	2,863
385	2,33	2,33	20,33	0,000	0,000	5,100	445	18,75	6,25	0,00	0,667	3,589	0,844
386	2,33	2,33	20,33	2,667	0,367	2,067	446	18,75	6,25	0,00	3,400	1,033	0,667
387	2,33	2,33	20,33	4,000	0,367	0,733	447	18,75	6,25	0,00	2,267	1,500	1,333
388	2,33	2,33	20,33	4,000	0,400	0,700	448	18,75	6,25	0,00	2,267	1,333	1,500
389	2,33	2,33	20,33	1,000	0,775	3,325	449	6,25	18,75	0,00	0,000	0,000	5,100
390	2,33	2,33	20,33	2,000	0,775	2,325	450	6,25	18,75	0,00	2,667	0,367	2,067
391	2,33	2,33	20,33	3,000	0,775	1,325	451	6,25	18,75	0,00	4,000	0,367	0,733
392	2,33	2,33	20,33	3,000	1,050	1,050	452	6,25	18,75	0,00	4,000	0,400	0,700
393	2,33	2,33	20,33	3,000	1,325	0,775	453	6,25	18,75	0,00	1,000	0,775	3,325
394	2,33	2,33	20,33	2,000	1,550	1,550	454	6,25	18,75	0,00	2,000	0,775	2,325
395	2,33	2,33	20,33	0,000	1,700	3,400	455	6,25	18,75	0,00	3,000	0,775	1,325
396	2,33	2,33	20,33	1,333	1,700	2,067	456	6,25	18,75	0,00	3,000	1,050	1,050
397	2,33	2,33	20,33	1,000	2,050	2,050	457	6,25	18,75	0,00	3,000	1,325	0,775
398	2,33	2,33	20,33	1,333	2,067	1,700	458	6,25	18,75	0,00	2,000	1,550	1,550
399	2,33	2,33	20,33	2,667	2,067	0,367	459	6,25	18,75	0,00	0,000	1,700	3,400
400	2,33	2,33	20,33	2,000	2,325	0,775	460	6,25	18,75	0,00	1,333	1,700	2,067
401	2,33	2,33	20,33	0,000	2,550	2,550	461	6,25	18,75	0,00	1,000	2,050	2,050
402	2,33	2,33	20,33	1,000	3,325	0,775	462	6,25	18,75	0,00	1,333	2,067	1,700
403	2,33	2,33	20,33	0,000	3,400	1,700	463	6,25	18,75	0,00	2,667	2,067	0,367
404	2,33	2,33	20,33	0,000	5,100	0,000	464	6,25	18,75	0,00	2,000	2,325	0,775
405	2,33	2,33	20,33	0,850	3,967	0,283	465	6,25	18,75	0,00	0,000	2,550	2,550
406	2,33	2,33	20,33	0,850	0,283	3,967	466	6,25	18,75	0,00	1,000	3,325	0,775
407	2,33	2,33	20,33	0,000	3,967	1,133	467	6,25	18,75	0,00	0,000	3,400	1,700
408	2,33	2,33	20,33	0,000	1,133	3,967	468	6,25	18,75	0,00	0,000	5,100	0,000
409	2,33	2,33	20,33	1,417	2,550	1,133	469	6,25	18,75	0,00	0,850	3,967	0,283
410	2,33	2,33	20,33	1,417	1,133	2,550	470	6,25	18,75	0,00	0,850	0,283	3,967
411	2,33	2,33	20,33	0,567	2,863	1,670	471	6,25	18,75	0,00	0,000	3,967	1,133
412	2,33	2,33	20,33	0,567	1,670	2,863	472	6,25	18,75	0,00	0,000	1,133	3,967
413	2,33	2,33	20,33	0,667	3,589	0,844	473	6,25	18,75	0,00	1,417	2,550	1,133
414	2,33	2,33	20,33	3,400	1,033	0,667	474	6,25	18,75	0,00	1,417	1,133	2,550
415	2,33	2,33	20,33	2,267	1,500	1,333	475	6,25	18,75	0,00	0,567	2,863	1,670
416	2,33	2,33	20,33	2,267	1,333	1,500	476	6,25	18,75	0,00	0,567	1,670	2,863
417	18,75	6,25	0,00	0,000	0,000	5,100	477	6,25	18,75	0,00	0,667	3,589	0,844
418	18,75	6,25	0,00	2,667	0,367	2,067	478	6,25	18,75	0,00	3,400	1,033	0,667
419	18,75	6,25	0,00	4,000	0,367	0,733	479	6,25	18,75	0,00	2,267	1,500	1,333
420	18,75	6,25	0,00	4,000	0,400	0,700	480	6,25	18,75	0,00	2,267	1,333	1,500

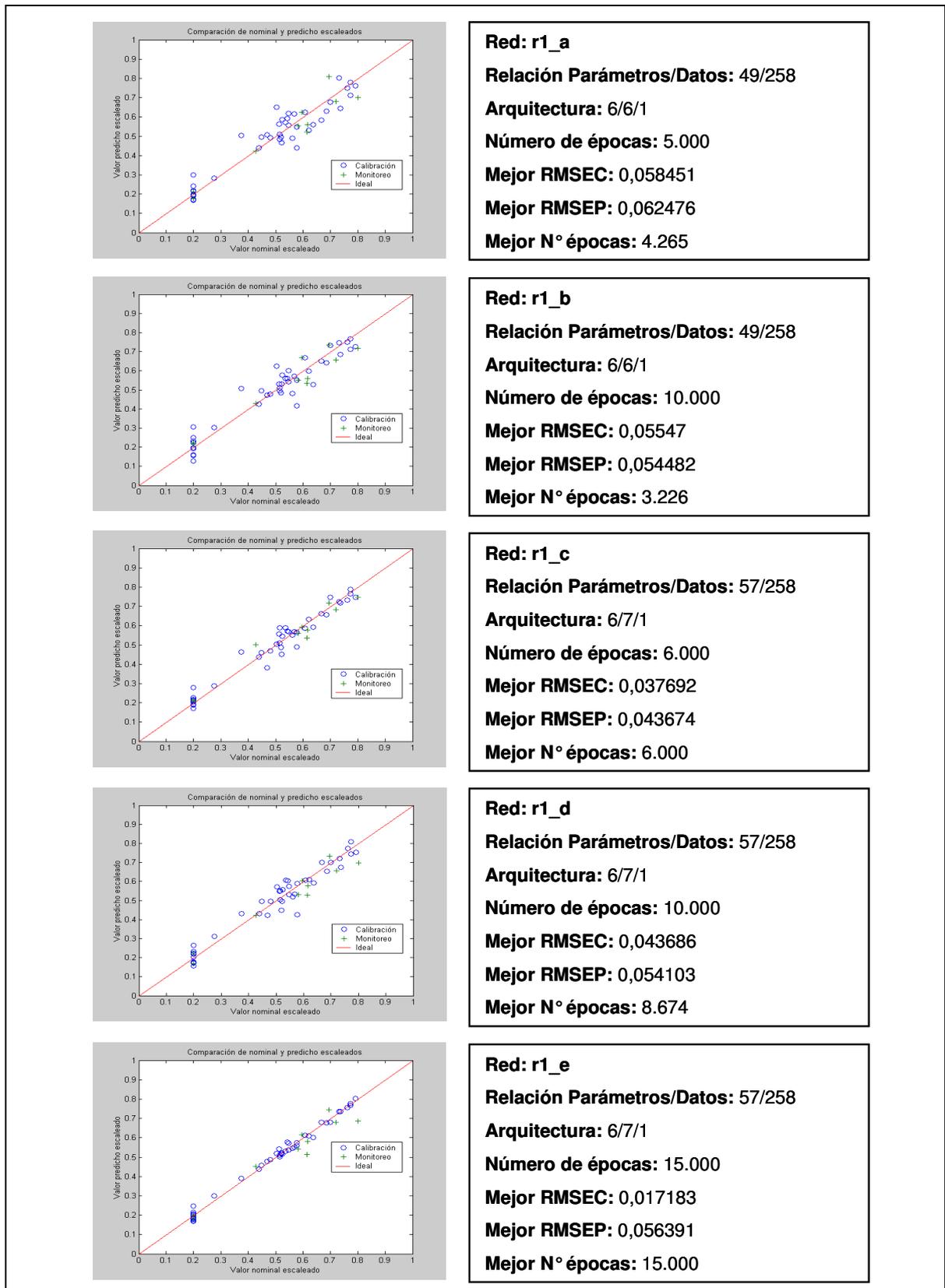
Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn	Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn
481	0,00	18,75	6,25	0,000	0,000	5,100	541	0,00	6,25	18,75	0,667	3,589	0,844
482	0,00	18,75	6,25	2,667	0,367	2,067	542	0,00	6,25	18,75	3,400	1,033	0,667
483	0,00	18,75	6,25	4,000	0,367	0,733	543	0,00	6,25	18,75	2,267	1,500	1,333
484	0,00	18,75	6,25	4,000	0,400	0,700	544	0,00	6,25	18,75	2,267	1,333	1,500
485	0,00	18,75	6,25	1,000	0,775	3,325	545	18,75	0,00	6,25	0,000	0,000	5,100
486	0,00	18,75	6,25	2,000	0,775	2,325	546	18,75	0,00	6,25	2,667	0,367	2,067
487	0,00	18,75	6,25	3,000	0,775	1,325	547	18,75	0,00	6,25	4,000	0,367	0,733
488	0,00	18,75	6,25	3,000	1,050	1,050	548	18,75	0,00	6,25	4,000	0,400	0,700
489	0,00	18,75	6,25	3,000	1,325	0,775	549	18,75	0,00	6,25	1,000	0,775	3,325
490	0,00	18,75	6,25	2,000	1,550	1,550	550	18,75	0,00	6,25	2,000	0,775	2,325
491	0,00	18,75	6,25	0,000	1,700	3,400	551	18,75	0,00	6,25	3,000	0,775	1,325
492	0,00	18,75	6,25	1,333	1,700	2,067	552	18,75	0,00	6,25	3,000	1,050	1,050
493	0,00	18,75	6,25	1,000	2,050	2,050	553	18,75	0,00	6,25	3,000	1,325	0,775
494	0,00	18,75	6,25	1,333	2,067	1,700	554	18,75	0,00	6,25	2,000	1,550	1,550
495	0,00	18,75	6,25	2,667	2,067	0,367	555	18,75	0,00	6,25	0,000	1,700	3,400
496	0,00	18,75	6,25	2,000	2,325	0,775	556	18,75	0,00	6,25	1,333	1,700	2,067
497	0,00	18,75	6,25	0,000	2,550	2,550	557	18,75	0,00	6,25	1,000	2,050	2,050
498	0,00	18,75	6,25	1,000	3,325	0,775	558	18,75	0,00	6,25	1,333	2,067	1,700
499	0,00	18,75	6,25	0,000	3,400	1,700	559	18,75	0,00	6,25	2,667	2,067	0,367
500	0,00	18,75	6,25	0,000	5,100	0,000	560	18,75	0,00	6,25	2,000	2,325	0,775
501	0,00	18,75	6,25	0,850	3,967	0,283	561	18,75	0,00	6,25	0,000	2,550	2,550
502	0,00	18,75	6,25	0,850	0,283	3,967	562	18,75	0,00	6,25	1,000	3,325	0,775
503	0,00	18,75	6,25	0,000	3,967	1,133	563	18,75	0,00	6,25	0,000	3,400	1,700
504	0,00	18,75	6,25	0,000	1,133	3,967	564	18,75	0,00	6,25	0,000	5,100	0,000
505	0,00	18,75	6,25	1,417	2,550	1,133	565	18,75	0,00	6,25	0,850	3,967	0,283
506	0,00	18,75	6,25	1,417	1,133	2,550	566	18,75	0,00	6,25	0,850	0,283	3,967
507	0,00	18,75	6,25	0,567	2,863	1,670	567	18,75	0,00	6,25	0,000	3,967	1,133
508	0,00	18,75	6,25	0,567	1,670	2,863	568	18,75	0,00	6,25	0,000	1,133	3,967
509	0,00	18,75	6,25	0,667	3,589	0,844	569	18,75	0,00	6,25	1,417	2,550	1,133
510	0,00	18,75	6,25	3,400	1,033	0,667	570	18,75	0,00	6,25	1,417	1,133	2,550
511	0,00	18,75	6,25	2,267	1,500	1,333	571	18,75	0,00	6,25	0,567	2,863	1,670
512	0,00	18,75	6,25	2,267	1,333	1,500	572	18,75	0,00	6,25	0,567	1,670	2,863
513	0,00	6,25	18,75	0,000	0,000	5,100	573	18,75	0,00	6,25	0,667	3,589	0,844
514	0,00	6,25	18,75	2,667	0,367	2,067	574	18,75	0,00	6,25	3,400	1,033	0,667
515	0,00	6,25	18,75	4,000	0,367	0,733	575	18,75	0,00	6,25	2,267	1,500	1,333
516	0,00	6,25	18,75	4,000	0,400	0,700	576	18,75	0,00	6,25	2,267	1,333	1,500
517	0,00	6,25	18,75	1,000	0,775	3,325	577	6,25	0,00	18,75	0,000	0,000	5,100
518	0,00	6,25	18,75	2,000	0,775	2,325	578	6,25	0,00	18,75	2,667	0,367	2,067
519	0,00	6,25	18,75	3,000	0,775	1,325	579	6,25	0,00	18,75	4,000	0,367	0,733
520	0,00	6,25	18,75	3,000	1,050	1,050	580	6,25	0,00	18,75	4,000	0,400	0,700
521	0,00	6,25	18,75	3,000	1,325	0,775	581	6,25	0,00	18,75	1,000	0,775	3,325
522	0,00	6,25	18,75	2,000	1,550	1,550	582	6,25	0,00	18,75	2,000	0,775	2,325
523	0,00	6,25	18,75	0,000	1,700	3,400	583	6,25	0,00	18,75	3,000	0,775	1,325
524	0,00	6,25	18,75	1,333	1,700	2,067	584	6,25	0,00	18,75	3,000	1,050	1,050
525	0,00	6,25	18,75	1,000	2,050	2,050	585	6,25	0,00	18,75	3,000	1,325	0,775
526	0,00	6,25	18,75	1,333	2,067	1,700	586	6,25	0,00	18,75	2,000	1,550	1,550
527	0,00	6,25	18,75	2,667	2,067	0,367	587	6,25	0,00	18,75	0,000	1,700	3,400
528	0,00	6,25	18,75	2,000	2,325	0,775	588	6,25	0,00	18,75	1,333	1,700	2,067
529	0,00	6,25	18,75	0,000	2,550	2,550	589	6,25	0,00	18,75	1,000	2,050	2,050
530	0,00	6,25	18,75	1,000	3,325	0,775	590	6,25	0,00	18,75	1,333	2,067	1,700
531	0,00	6,25	18,75	0,000	3,400	1,700	591	6,25	0,00	18,75	2,667	2,067	0,367
532	0,00	6,25	18,75	0,000	5,100	0,000	592	6,25	0,00	18,75	2,000	2,325	0,775
533	0,00	6,25	18,75	0,850	3,967	0,283	593	6,25	0,00	18,75	0,000	2,550	2,550
534	0,00	6,25	18,75	0,850	0,283	3,967	594	6,25	0,00	18,75	1,000	3,325	0,775
535	0,00	6,25	18,75	0,000	3,967	1,133	595	6,25	0,00	18,75	0,000	3,400	1,700
536	0,00	6,25	18,75	0,000	1,133	3,967	596	6,25	0,00	18,75	0,000	5,100	0,000
537	0,00	6,25	18,75	1,417	2,550	1,133	597	6,25	0,00	18,75	0,850	3,967	0,283
538	0,00	6,25	18,75	1,417	1,133	2,550	598	6,25	0,00	18,75	0,850	0,283	3,967
539	0,00	6,25	18,75	0,567	2,863	1,670	599	6,25	0,00	18,75	0,000	3,967	1,133
540	0,00	6,25	18,75	0,567	1,670	2,863	600	6,25	0,00	18,75	0,000	1,133	3,967

Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn	Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn
601	6,25	0,00	18,75	1,417	2,550	1,133	661	12,50	8,50	4,00	0,850	3,967	0,283
602	6,25	0,00	18,75	1,417	1,133	2,550	662	12,50	8,50	4,00	0,850	0,283	3,967
603	6,25	0,00	18,75	0,567	2,863	1,670	663	12,50	8,50	4,00	0,000	3,967	1,133
604	6,25	0,00	18,75	0,567	1,670	2,863	664	12,50	8,50	4,00	0,000	1,133	3,967
605	6,25	0,00	18,75	0,667	3,589	0,844	665	12,50	8,50	4,00	1,417	2,550	1,133
606	6,25	0,00	18,75	3,400	1,033	0,667	666	12,50	8,50	4,00	1,417	1,133	2,550
607	6,25	0,00	18,75	2,267	1,500	1,333	667	12,50	8,50	4,00	0,567	2,863	1,670
608	6,25	0,00	18,75	2,267	1,333	1,500	668	12,50	8,50	4,00	0,567	1,670	2,863
609	12,50	4,00	8,50	0,000	0,000	5,100	669	12,50	8,50	4,00	0,667	3,589	0,844
610	12,50	4,00	8,50	2,667	0,367	2,067	670	12,50	8,50	4,00	3,400	1,033	0,667
611	12,50	4,00	8,50	4,000	0,367	0,733	671	12,50	8,50	4,00	2,267	1,500	1,333
612	12,50	4,00	8,50	4,000	0,400	0,700	672	12,50	8,50	4,00	2,267	1,333	1,500
613	12,50	4,00	8,50	1,000	0,775	3,325	673	4,00	12,50	8,50	0,000	0,000	5,100
614	12,50	4,00	8,50	2,000	0,775	2,325	674	4,00	12,50	8,50	2,667	0,367	2,067
615	12,50	4,00	8,50	3,000	0,775	1,325	675	4,00	12,50	8,50	4,000	0,367	0,733
616	12,50	4,00	8,50	3,000	1,050	1,050	676	4,00	12,50	8,50	4,000	0,400	0,700
617	12,50	4,00	8,50	3,000	1,325	0,775	677	4,00	12,50	8,50	1,000	0,775	3,325
618	12,50	4,00	8,50	2,000	1,550	1,550	678	4,00	12,50	8,50	2,000	0,775	2,325
619	12,50	4,00	8,50	0,000	1,700	3,400	679	4,00	12,50	8,50	3,000	0,775	1,325
620	12,50	4,00	8,50	1,333	1,700	2,067	680	4,00	12,50	8,50	3,000	1,050	1,050
621	12,50	4,00	8,50	1,000	2,050	2,050	681	4,00	12,50	8,50	3,000	1,325	0,775
622	12,50	4,00	8,50	1,333	2,067	1,700	682	4,00	12,50	8,50	2,000	1,550	1,550
623	12,50	4,00	8,50	2,667	2,067	0,367	683	4,00	12,50	8,50	0,000	1,700	3,400
624	12,50	4,00	8,50	2,000	2,325	0,775	684	4,00	12,50	8,50	1,333	1,700	2,067
625	12,50	4,00	8,50	0,000	2,550	2,550	685	4,00	12,50	8,50	1,000	2,050	2,050
626	12,50	4,00	8,50	1,000	3,325	0,775	686	4,00	12,50	8,50	1,333	2,067	1,700
627	12,50	4,00	8,50	0,000	3,400	1,700	687	4,00	12,50	8,50	2,667	2,067	0,367
628	12,50	4,00	8,50	0,000	5,100	0,000	688	4,00	12,50	8,50	2,000	2,325	0,775
629	12,50	4,00	8,50	0,850	3,967	0,283	689	4,00	12,50	8,50	0,000	2,550	2,550
630	12,50	4,00	8,50	0,850	0,283	3,967	690	4,00	12,50	8,50	1,000	3,325	0,775
631	12,50	4,00	8,50	0,000	3,967	1,133	691	4,00	12,50	8,50	0,000	3,400	1,700
632	12,50	4,00	8,50	0,000	1,133	3,967	692	4,00	12,50	8,50	0,000	5,100	0,000
633	12,50	4,00	8,50	1,417	2,550	1,133	693	4,00	12,50	8,50	0,850	3,967	0,283
634	12,50	4,00	8,50	1,417	1,133	2,550	694	4,00	12,50	8,50	0,850	0,283	3,967
635	12,50	4,00	8,50	0,567	2,863	1,670	695	4,00	12,50	8,50	0,000	3,967	1,133
636	12,50	4,00	8,50	0,567	1,670	2,863	696	4,00	12,50	8,50	0,000	1,133	3,967
637	12,50	4,00	8,50	0,667	3,589	0,844	697	4,00	12,50	8,50	1,417	2,550	1,133
638	12,50	4,00	8,50	3,400	1,033	0,667	698	4,00	12,50	8,50	1,417	1,133	2,550
639	12,50	4,00	8,50	2,267	1,500	1,333	699	4,00	12,50	8,50	0,567	2,863	1,670
640	12,50	4,00	8,50	2,267	1,333	1,500	700	4,00	12,50	8,50	0,567	1,670	2,863
641	12,50	8,50	4,00	0,000	0,000	5,100	701	4,00	12,50	8,50	0,667	3,589	0,844
642	12,50	8,50	4,00	2,667	0,367	2,067	702	4,00	12,50	8,50	3,400	1,033	0,667
643	12,50	8,50	4,00	4,000	0,367	0,733	703	4,00	12,50	8,50	2,267	1,500	1,333
644	12,50	8,50	4,00	4,000	0,400	0,700	704	4,00	12,50	8,50	2,267	1,333	1,500
645	12,50	8,50	4,00	1,000	0,775	3,325	705	8,33	12,50	4,00	0,000	0,000	5,100
646	12,50	8,50	4,00	2,000	0,775	2,325	706	8,33	12,50	4,00	2,667	0,367	2,067
647	12,50	8,50	4,00	3,000	0,775	1,325	707	8,33	12,50	4,00	4,000	0,367	0,733
648	12,50	8,50	4,00	3,000	1,050	1,050	708	8,33	12,50	4,00	4,000	0,400	0,700
649	12,50	8,50	4,00	3,000	1,325	0,775	709	8,33	12,50	4,00	1,000	0,775	3,325
650	12,50	8,50	4,00	2,000	1,550	1,550	710	8,33	12,50	4,00	2,000	0,775	2,325
651	12,50	8,50	4,00	0,000	1,700	3,400	711	8,33	12,50	4,00	3,000	0,775	1,325
652	12,50	8,50	4,00	1,333	1,700	2,067	712	8,33	12,50	4,00	3,000	1,050	1,050
653	12,50	8,50	4,00	1,000	2,050	2,050	713	8,33	12,50	4,00	3,000	1,325	0,775
654	12,50	8,50	4,00	1,333	2,067	1,700	714	8,33	12,50	4,00	2,000	1,550	1,550
655	12,50	8,50	4,00	2,667	2,067	0,367	715	8,33	12,50	4,00	0,000	1,700	3,400
656	12,50	8,50	4,00	2,000	2,325	0,775	716	8,33	12,50	4,00	1,333	1,700	2,067
657	12,50	8,50	4,00	0,000	2,550	2,550	717	8,33	12,50	4,00	1,000	2,050	2,050
658	12,50	8,50	4,00	1,000	3,325	0,775	718	8,33	12,50	4,00	1,333	2,067	1,700
659	12,50	8,50	4,00	0,000	3,400	1,700	719	8,33	12,50	4,00	2,667	2,067	0,367
660	12,50	8,50	4,00	0,000	5,100	0,000	720	8,33	12,50	4,00	2,000	2,325	0,775

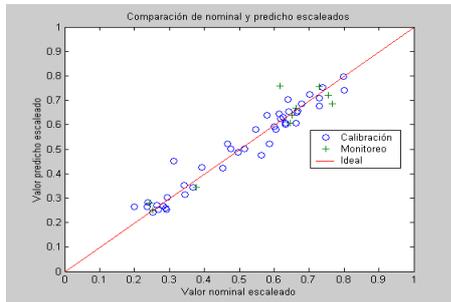
Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn	Mezcla	Glc	Gal	Man	Gln	Glu	Asn
721	8,33	12,50	4,00	0,000	2,550	2,550	781	8,50	4,00	12,5	1,000	2,050	2,050
722	8,33	12,50	4,00	1,000	3,325	0,775	782	8,50	4,00	12,5	1,333	2,067	1,700
723	8,33	12,50	4,00	0,000	3,400	1,700	783	8,50	4,00	12,5	2,667	2,067	0,367
724	8,33	12,50	4,00	0,000	5,100	0,000	784	8,50	4,00	12,5	2,000	2,325	0,775
725	8,33	12,50	4,00	0,850	3,967	0,283	785	8,50	4,00	12,5	0,000	2,550	2,550
726	8,33	12,50	4,00	0,850	0,283	3,967	786	8,50	4,00	12,5	1,000	3,325	0,775
727	8,33	12,50	4,00	0,000	3,967	1,133	787	8,50	4,00	12,5	0,000	3,400	1,700
728	8,33	12,50	4,00	0,000	1,133	3,967	788	8,50	4,00	12,5	0,000	5,100	0,000
729	8,33	12,50	4,00	1,417	2,550	1,133	789	8,50	4,00	12,5	0,850	3,967	0,283
730	8,33	12,50	4,00	1,417	1,133	2,550	790	8,50	4,00	12,5	0,850	0,283	3,967
731	8,33	12,50	4,00	0,567	2,863	1,670	791	8,50	4,00	12,5	0,000	3,967	1,133
732	8,33	12,50	4,00	0,567	1,670	2,863	792	8,50	4,00	12,5	0,000	1,133	3,967
733	8,33	12,50	4,00	0,667	3,589	0,844	793	8,50	4,00	12,5	1,417	2,550	1,133
734	8,33	12,50	4,00	3,400	1,033	0,667	794	8,50	4,00	12,5	1,417	1,133	2,550
735	8,33	12,50	4,00	2,267	1,500	1,333	795	8,50	4,00	12,5	0,567	2,863	1,670
736	8,33	12,50	4,00	2,267	1,333	1,500	796	8,50	4,00	12,5	0,567	1,670	2,863
737	4,00	8,50	12,5	0,000	0,000	5,100	797	8,50	4,00	12,5	0,667	3,589	0,844
738	4,00	8,50	12,5	2,667	0,367	2,067	798	8,50	4,00	12,5	3,400	1,033	0,667
739	4,00	8,50	12,5	4,000	0,367	0,733	799	8,50	4,00	12,5	2,267	1,500	1,333
740	4,00	8,50	12,5	4,000	0,400	0,700	800	8,50	4,00	12,5	2,267	1,333	1,500
741	4,00	8,50	12,5	1,000	0,775	3,325							
742	4,00	8,50	12,5	2,000	0,775	2,325							
743	4,00	8,50	12,5	3,000	0,775	1,325							
744	4,00	8,50	12,5	3,000	1,050	1,050							
745	4,00	8,50	12,5	3,000	1,325	0,775							
746	4,00	8,50	12,5	2,000	1,550	1,550							
747	4,00	8,50	12,5	0,000	1,700	3,400							
748	4,00	8,50	12,5	1,333	1,700	2,067							
749	4,00	8,50	12,5	1,000	2,050	2,050							
750	4,00	8,50	12,5	1,333	2,067	1,700							
751	4,00	8,50	12,5	2,667	2,067	0,367							
752	4,00	8,50	12,5	2,000	2,325	0,775							
753	4,00	8,50	12,5	0,000	2,550	2,550							
754	4,00	8,50	12,5	1,000	3,325	0,775							
755	4,00	8,50	12,5	0,000	3,400	1,700							
756	4,00	8,50	12,5	0,000	5,100	0,000							
757	4,00	8,50	12,5	0,850	3,967	0,283							
758	4,00	8,50	12,5	0,850	0,283	3,967							
759	4,00	8,50	12,5	0,000	3,967	1,133							
760	4,00	8,50	12,5	0,000	1,133	3,967							
761	4,00	8,50	12,5	1,417	2,550	1,133							
762	4,00	8,50	12,5	1,417	1,133	2,550							
763	4,00	8,50	12,5	0,567	2,863	1,670							
764	4,00	8,50	12,5	0,567	1,670	2,863							
765	4,00	8,50	12,5	0,667	3,589	0,844							
766	4,00	8,50	12,5	3,400	1,033	0,667							
767	4,00	8,50	12,5	2,267	1,500	1,333							
768	4,00	8,50	12,5	2,267	1,333	1,500							
769	8,50	4,00	12,5	0,000	0,000	5,100							
770	8,50	4,00	12,5	2,667	0,367	2,067							
771	8,50	4,00	12,5	4,000	0,367	0,733							
772	8,50	4,00	12,5	4,000	0,400	0,700							
773	8,50	4,00	12,5	1,000	0,775	3,325							
774	8,50	4,00	12,5	2,000	0,775	2,325							
775	8,50	4,00	12,5	3,000	0,775	1,325							
776	8,50	4,00	12,5	3,000	1,050	1,050							
777	8,50	4,00	12,5	3,000	1,325	0,775							
778	8,50	4,00	12,5	2,000	1,550	1,550							
779	8,50	4,00	12,5	0,000	1,700	3,400							
780	8,50	4,00	12,5	1,333	1,700	2,067							

10.4. ANEXO 4: RESPUESTA PREDICHA POR LA RED VERSUS LA RESPUESTA NOMINAL.

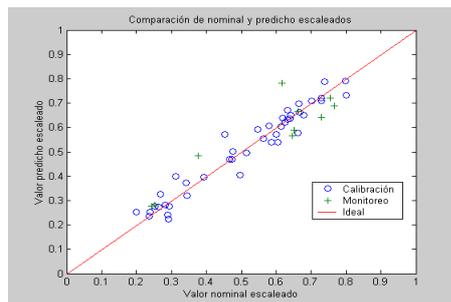
Distribución normalizada de los puntos de μ (r_1) obtenidos de como respuesta predicha por la red en función de los valores nominales (empíricos) de esa respuesta, para los conjuntos de calibración (o) y monitoreo (+).



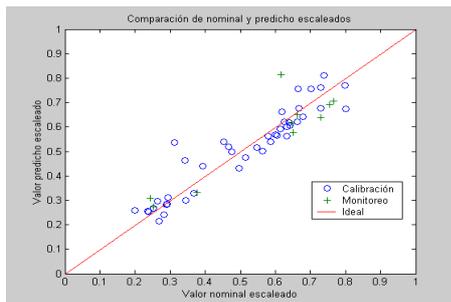
Distribución normalizada de los puntos de ICV (r2) obtenidos de como respuesta predicha por la red en función de los valores nominales (empíricos) de esa respuesta, para los conjuntos de calibración (o) y monitoreo (+).



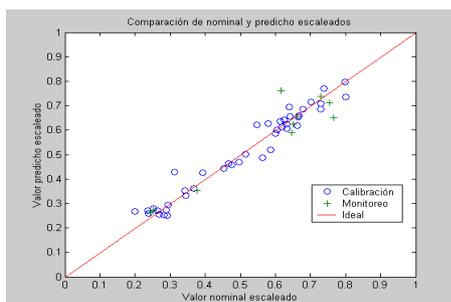
Red: r2_a
Relación Parámetros/Datos: 49/258
Arquitectura: 6/6/1
Número de épocas: 10.000
Mejor RMSEC: 0,041059
Mejor RMSEP: 0,057224
Mejor N° épocas: 7.046



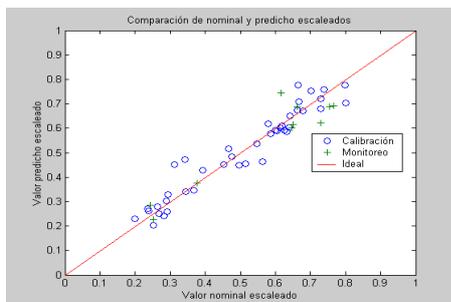
Red: r2_b
Relación Parámetros/Datos: 41/258
Arquitectura: 6/5/1
Número de épocas: 15.000
Mejor RMSEC: 0,041994
Mejor RMSEP: 0,081231
Mejor N° épocas: 15.000



Red: r2_c
Relación Parámetros/Datos: 41/258
Arquitectura: 6/5/1
Número de épocas: 10.000
Mejor RMSEC: 0,060502
Mejor RMSEP: 0,082306
Mejor N° épocas: 9.979

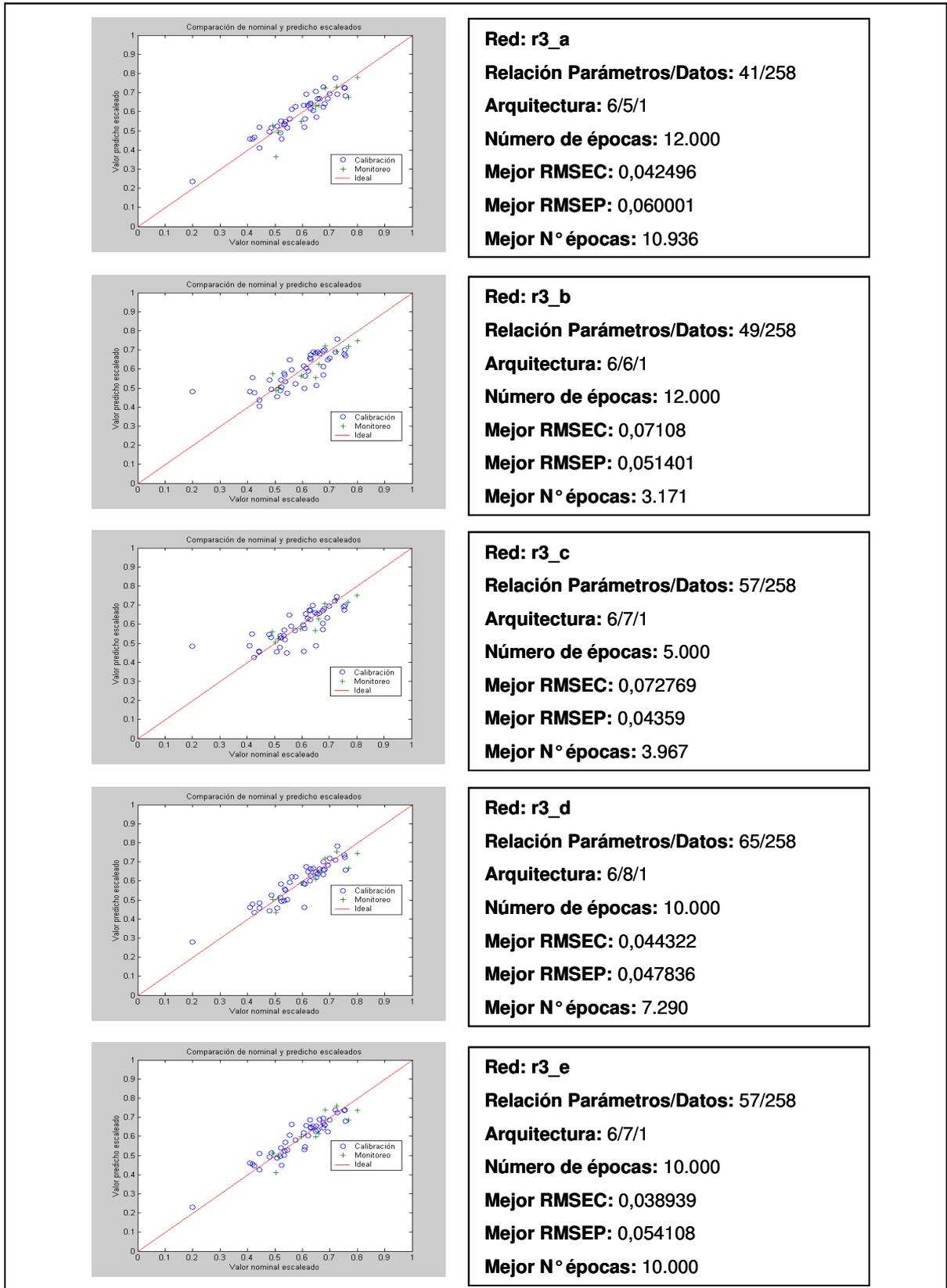


Red: r2_d
Relación Parámetros/Datos: 57/258
Arquitectura: 6/7/1
Número de épocas: 10.000
Mejor RMSEC: 0,036975
Mejor RMSEP: 0,064925
Mejor N° épocas: 6.487

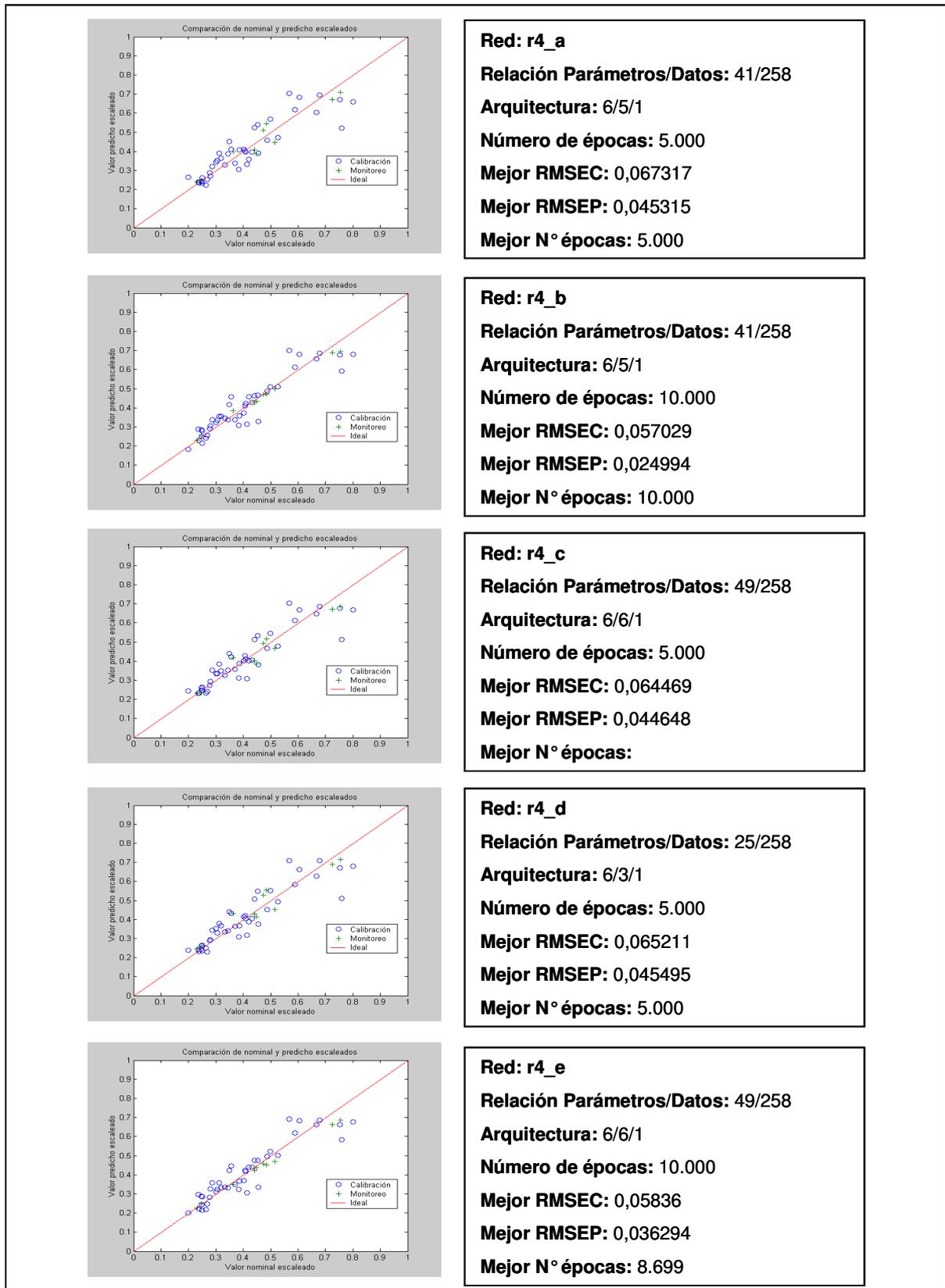


Red: r2_e
Relación Parámetros/Datos: 49/258
Arquitectura: 6/6/1
Número de épocas: 10.000
Mejor RMSEC: 0,04944
Mejor RMSEP: 0,066572
Mejor N° épocas: 9.339

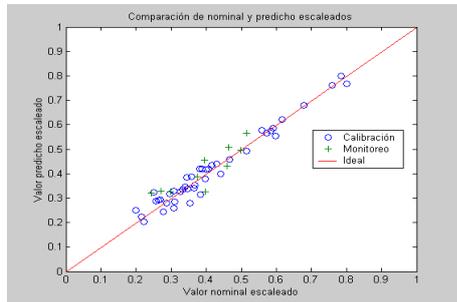
Distribución normalizada de los puntos de q_{fac} (r_3) obtenidos de como respuesta predicha por la red en función de los valores nominales (empíricos) de esa respuesta, para los conjuntos de calibración (o) y monitoreo (+).



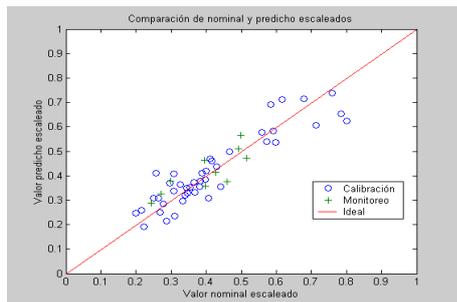
Distribución normalizada de los puntos de q_{am} (r_4) obtenidos de como respuesta predicha por la red en función de los valores nominales (empíricos) de esa respuesta, para los conjuntos de calibración (o) y monitoreo (+).



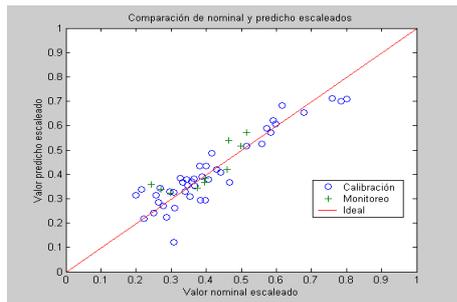
Distribución normalizada de los puntos de q_{rhEPO} (r_5) obtenidos de como respuesta predicha por la red en función de los valores nominales (empíricos) de esa respuesta, para los conjuntos de calibración (o) y monitoreo (+).



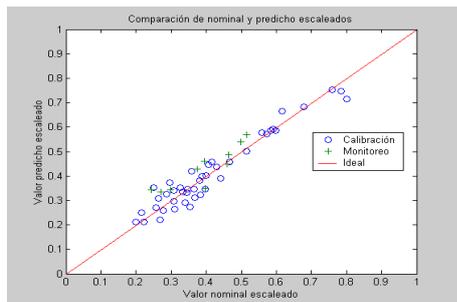
Red: r5_a
Relación Parámetros/Datos: 49/258
Arquitectura: 6/6/1
Número de épocas: 10.000
Mejor RMSEC: 0,030016
Mejor RMSEP: 0,04907
Mejor N° épocas: 10.000



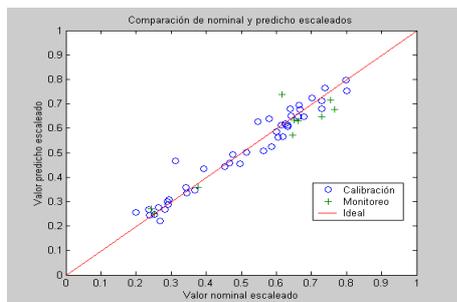
Red: r5_b
Relación Parámetros/Datos: 49/258
Arquitectura: 6/6/1
Número de épocas: 5.000
Mejor RMSEC: 0,064498
Mejor RMSEP: 0,055842
Mejor N° épocas: 3.427



Red: r5_c
Relación Parámetros/Datos: 41/258
Arquitectura: 6/5/1
Número de épocas: 10.000
Mejor RMSEC: 0,059775
Mejor RMSEP: 0,055329
Mejor N° épocas: 10.000

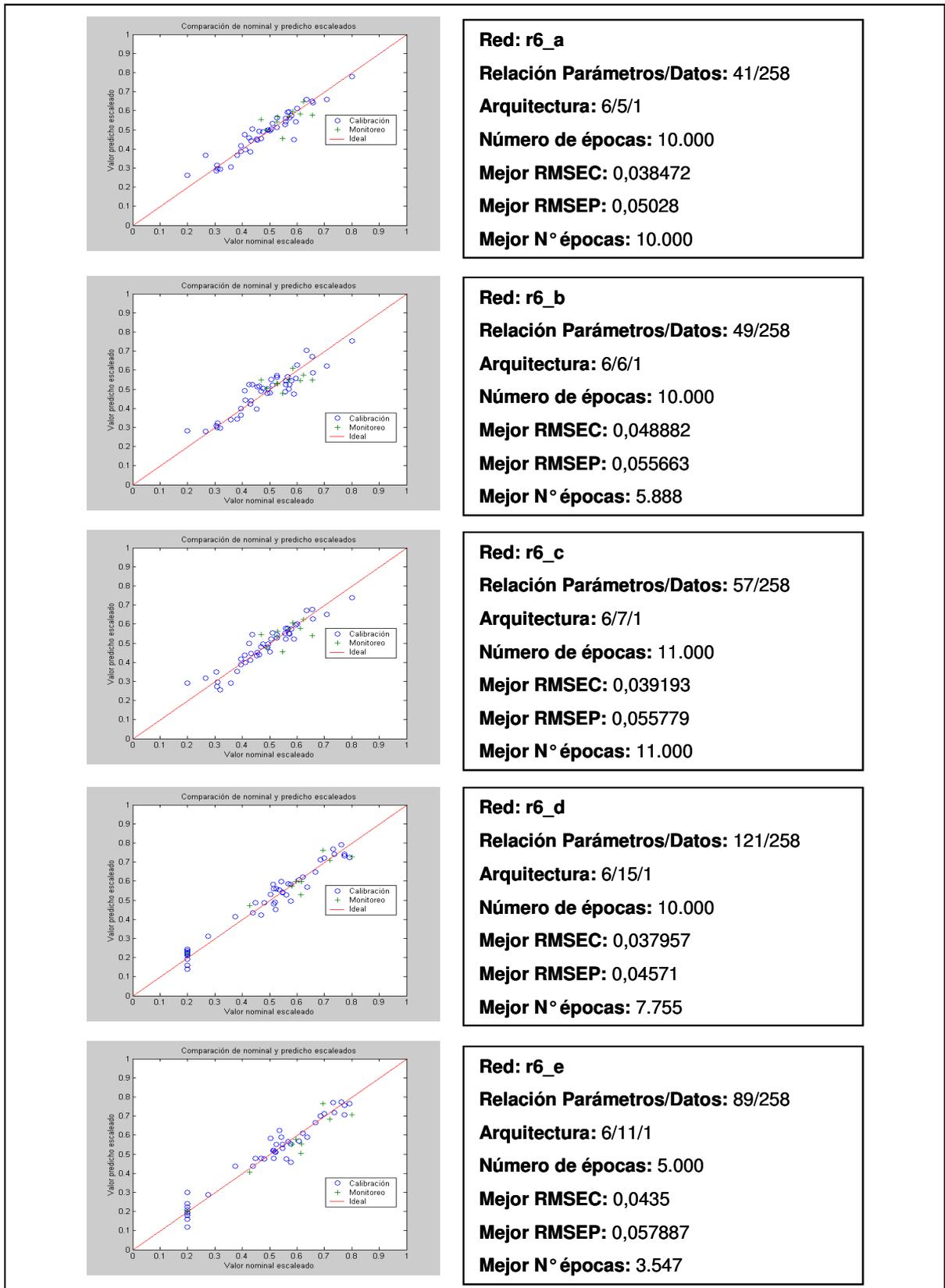


Red: r5_d
Relación Parámetros/Datos: 57/258
Arquitectura: 6/7/1
Número de épocas: 5.000
Mejor RMSEC: 0,039984
Mejor RMSEP: 0,055582
Mejor N° épocas: 5.000

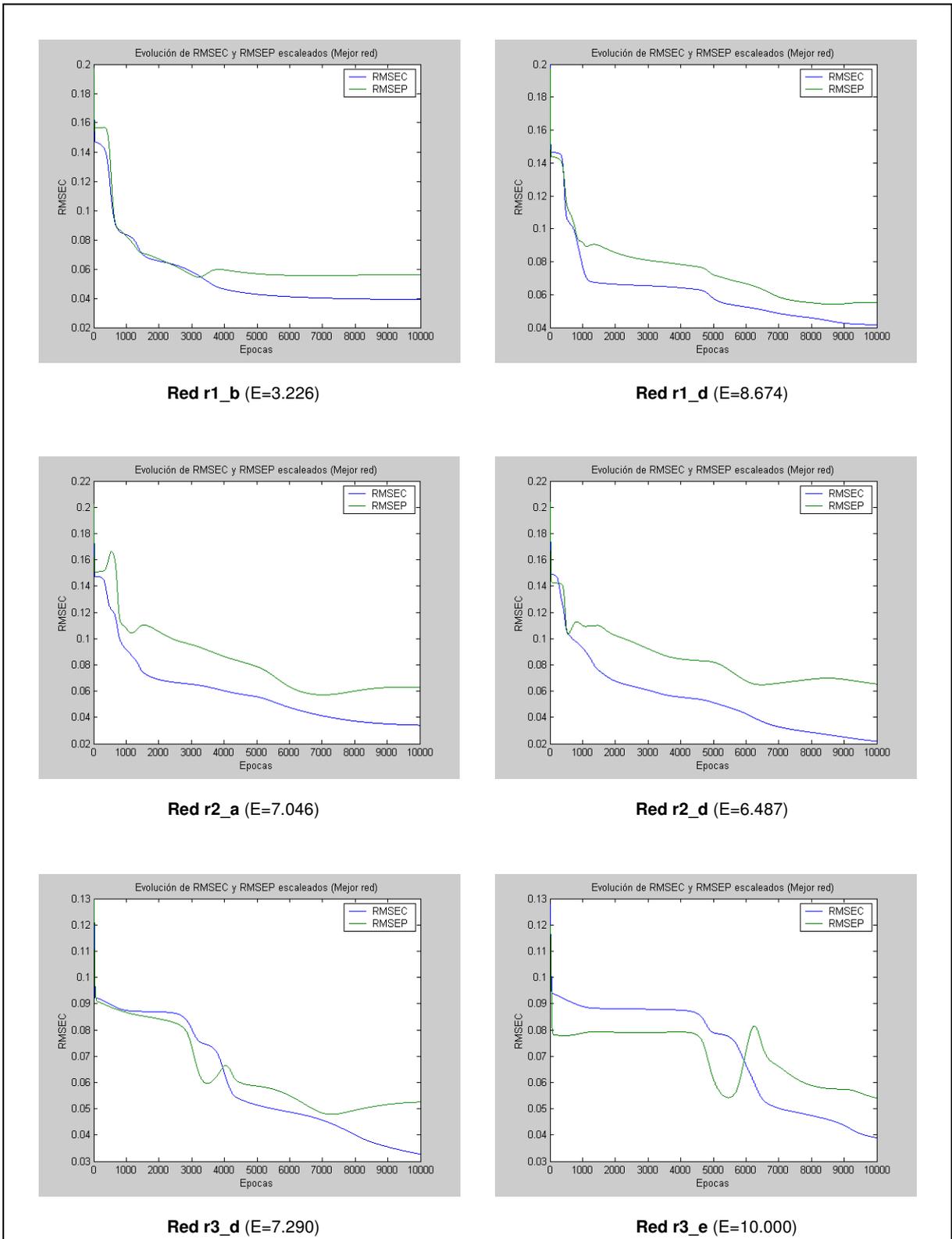


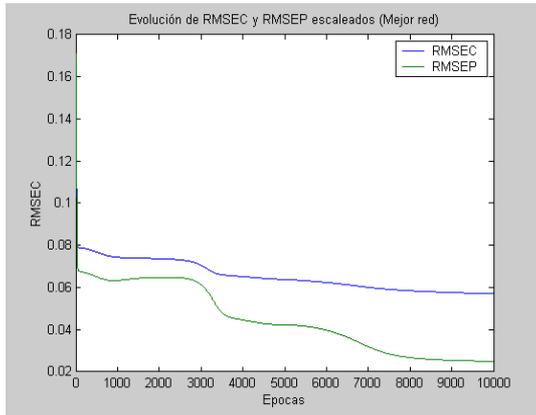
Red: r5_e
Relación Parámetros/Datos: 89/258
Arquitectura: 6/11/1
Número de épocas: 10.000
Mejor RMSEC: 0,039991
Mejor RMSEP: 0,062209
Mejor N° épocas: 4.293

Distribución normalizada de los puntos de AB_t (r_6) obtenidos de como respuesta predicha por la red en función de los valores nominales (empíricos) de esa respuesta, para los conjuntos de calibración (o) y monitoreo (+).

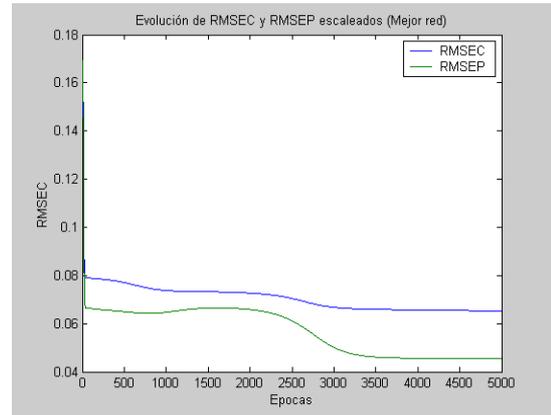


10.5. ANEXO 5: EVOLUCIÓN DE RMSEC Y RMSEP EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE ÉPOCAS DEL ENTRENAMIENTO DE LAS REDES SELECCIONADAS PARA CADA RESPUESTA.

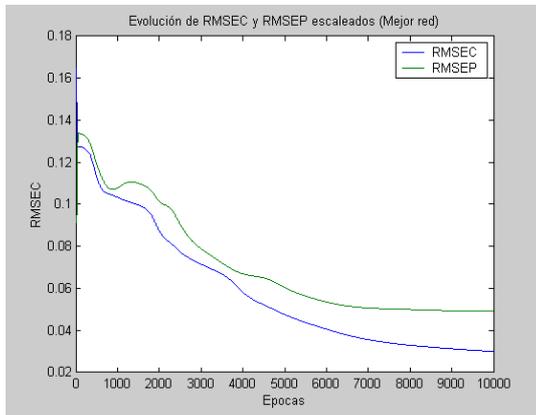




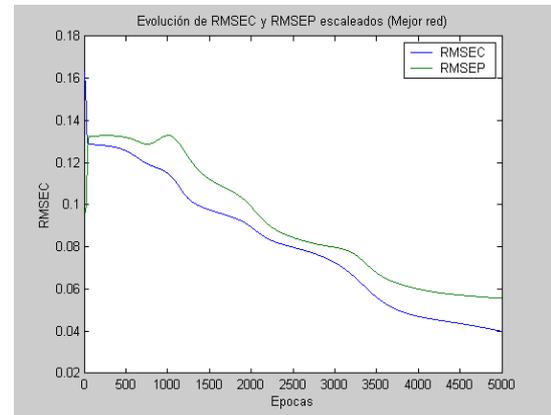
Red r4_b (E=10.000)



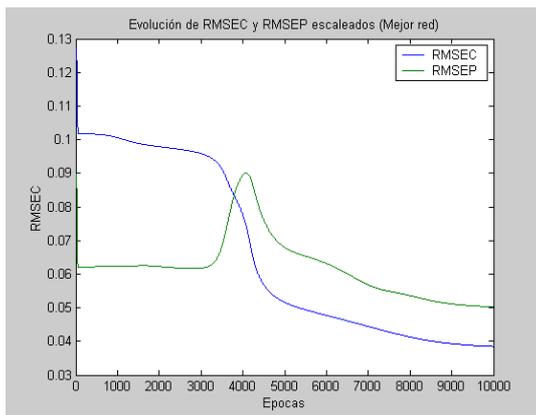
Red r4_d (E=5.000)



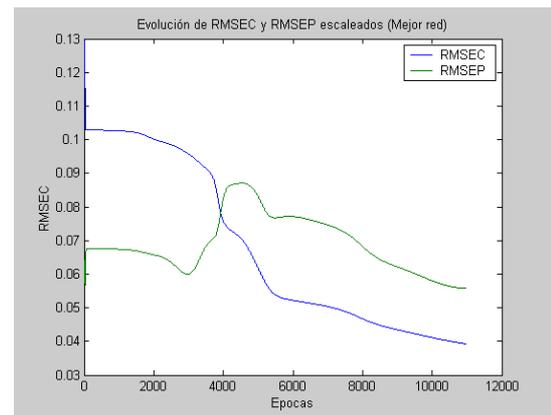
Red r5_a (E=10.000)



Red r5_d (E=5.000)



Red r6_a (E=10.000)



Red r6_c (E=11.000)

11-BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adinarayana, K.; Ellaiah, P.; Srinivasulu, B.; Bhavani Devi, R. y Adinarayana, G. (2003) *Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by Streptomyces marinensis under solid-state fermentation*. Process Biochem. 38(11):1565-1572.
- Ahuja, S.K.; Ferreira, G.M. y Moreira, A.R. (2004) *Application of Plackett-Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium*. Biotechnol. Bioeng. 85(6):666-675.
- Altamirano, C.; Paredes, C.; Cairó, J.J. y Gòdia, F. (2000) *Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine*. Biotechnol. Progr. 16:69-75.
- Altamirano, C.; Cairó, J.J. y Gòdia, F. (2001a) *Decoupling cell growth and product formation in Chinese hamster ovary cells through metabolic control*. Biotechnol. Bioeng. 76(4):351-360.
- Altamirano, C.; Illanes, A.; Casablancas, A.; Gámez, X.; Cairó, J.J. y Gòdia, F. (2001b) *Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based medium in continuous culture*. Biotechnol. Prog. 17:1032-1041.
- Altamirano, C.; Paredes, C.; Illanes, A.; Cairó, J.J. y Gòdia, F. (2004) *Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium*. J. Biotechnol. 110:171-179.
- Altamirano, C.; Illanes, A.; Becerra, S.; Cairó, J.J. y Gòdia, F. (2006a) *Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose*. J. Biotechnol. 125(4):547-556.
- Altamirano, C.; Illanes, A.; Canessa, R. y Becerra, S. (2006b) *Specific nutrient supplementation of defined serum-free medium for the improvement of CHO cells growth and t-PA production* [on line]. Electronic Journal of Biotechnology Vol. 9, Issue 1 (ISSN:0717-3458) <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue1/full/8/>
- Amadeo, G.I. (2003) *Purificación de eritropoyetina recombinante: Desarrollo de diferentes estrategias y escalamiento de procesos*. Tesis Doctoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Amadeo, I.; Oggero, M.R.; Zenclussen, M.L.; Robles, L.; Pereira, D.; Kratje, R. y Etcheverrigaray, M. (2004) *A single monoclonal antibody as probe to detect the entire set of native and partially unfolded rhEPO glycoforms*. J. Immunol. Methods 293:191-205.
- Andersen, D. y Goochee, C. (1995) *The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by CHO cells*. Biotechnol. Bioeng. 47(1):96-105.
- Angata, T.; Nakata, D.; Matsuda, T. y Kitajima, K. (1999) *Elevated expression of free deaminoneuraminic acid in mammalian cells cultured in mannose-rich media*. Biochem. Bioph. Res. Co. 261(2):326-331.
- Arathoon, W.R. y Birch, J.R. (1986) *Large-scale cell culture in biotechnology*. Science 232:1390-1395.
- Backer, M.; Metzger, L.; Slaber, P.; Nevitt, K. y Boder, G. (1988) *Large scale production of monoclonal antibodies in suspension culture*. Biotechnol. Bioeng. 32(8):993-1000.
- Baker, K.N.; Rendall, M.H.; Hills, A.E.; Hoare, M.; Freedman, R.B. y James, D.C. (2001) *Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells*. Biotechnol. Bioeng. 73(3):188-202.
- Barnes, D. y Sato, G. (1980) *Methods for growth of cultured cells in serum-free medium*. Anal. Biochem. 102(2):255-270.
- Baumann, H. y Jahreis, G.P. (1983) *Glucose starvation leads in rat hematoma cells to partially N-glycosylated glycoproteins including α 1-acid glycoproteins*. J. Biol. Chem. 258(6):3942-3949.
- Berthelot, M.P.E. (1859) *Violet d'aniline*. Repertorie Chimie Appliquée 1:284.

- Bevington, P. y Robinson, D.K. (1993) *Data reduction and error analysis for the physical sciences*. McGraw-Hill Ed., New York, EE.UU.
- Boehmelt, G.; Wakeham, A.; Elia, A.; Sasaki, T.; Plyte, S.; Potter, J.; Yang, Y.; Tsang, E.; Ruland, J.; Iscove, N.N.; Dennis, J.W. y Mak, T.W. (2000) *Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells*. The EMBO Journal 19:5092-5104.
- Bollati Fogolín, M. (2002) *Expresión de proteínas recombinantes de uso terapéutico en células eucariontes*. Tesis Doctoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Bollati Fogolín, M.; Wagner, R.; Etcheverrigaray, M. y Kratje, R. (2004) *Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF producing CHO cells*. J. Biotechnol. 109(1-2):179-191.
- Borys, M.C.; Linzer, D.I.H. y Papoutsakis, E.T. (1993) *Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells*. Bio/Technology 11:720-724.
- Borys, M.C.; Linzer, D.I.H. y Papoutsakis, E.T. (1994) *Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by Chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner*. Biotechnol. Bioeng. 43(6):505-514.
- Brereton, R. (2003) *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido.
- Butler, M. y Christie, A. (1994) *Adaptation of mammalian cells to non-ammoniogenic media*. Cytotechnology 15(13):87-94.
- Butler, M. y Huzel, N. (1997) *Optimization of the fatty acid composition of a hybridoma enhances MAb production and perturbs energy metabolism*. En: *Animal Cell Technology*. M.J.T. Carrondo (ed.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Butler, M. y Spier, R. (1984) *The effect of glutamine utilisation and ammonium production on the growth of BHK cells in microcarrier cultures*. J. Biotechnol. 1(3-4):187-196.
- Castro, P.M.L.; Hayter, P.M.; Ison, A.P. y Bull, A.T. (1992) *Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38(1):84-90.
- Castro, P.M.L.; Hayter, P.M.; Ison, A.P. y Bull, A.T. (1995) *CHO cell growth and recombinant interferon- γ production: effects of BSA, Pluronic and lipids*. Cytotechnology 19(1):27-36.
- Cazzola, M.; Mercuriali, F. y Brugnara, C. (1997) *Use of recombinant human erythropoietin outside the setting of uremia*. Blood 89:4248-4267.
- Chapman, R.; Sidrauski, C. y Walter, P. (1998) *Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus*. Annu. Rev. Cell. Dev. Bi. 14:459-485.
- Cheetham, J.C.; Smith, D.M. y Aoki, K.H. (1998) *NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation*. Nat. Struct. Biol. 5:861-866.
- Chotigeat, W.; Watanapokasin, Y.; Mahler, S. y Gray, P.P. (1994) *Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells*. Cytotechnology 15(1-3):217-221.
- Christie, A. y Butler, M. (1994) *Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalysed by a specific peptidase*. J. Biotechnol. 37:277-290.
- Christie, A. y Butler, M. (1999) *The adaptation of BHK cells to a non-ammoniogenic glutamate-based culture medium*. Biotechnol. Bioeng. 64(3):298-309
- Chu, L. y Robinson, D.K. (2001) *Industrial choices for protein production by large-scale cell culture*. Curr. Opin. Biotechnol. 12:180-187.
- Clough, B. (1998) *Cell lines for biotechnologists*. En: *Cell and tissue culture: Laboratory procedures in biotechnology*. A. Doyle y J.B. Griffiths (eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, EE.UU.
- Coleman, D.E. y Montgomery, D.C. (1993). *A systematic approach to planning for a designed industrial experiment*. Technometrics 35(1):1-12.

- Cook, J.A. y Mitchell, J.B. (1989) *Viability measurements in mammalian cell systems*. Anal. Biochem. 179:1-7.
- Cornell, J.A. (1990) *Experiments with mixtures: designs, models and the analysis of mixture data*, John Wiley and Sons, Inc. (ed.), New York, EE.UU.
- Cox, G.S. y McClure, D.S. (1983) *Effect of media composition on the induction of chorionic gonadotropin by sodium butyrate in HeLa cells*. In Vitro 19(1):1-6.
- Cruz, H.J.; Moreira, J.L.; Dias, E.M.; Peixoto, C.M.; Ferreira, A.S. y Carrondo, M.J.T. (1998) *Correlation between BHK cell specific productivity and metabolism*. En: *New developments and new applications in animal cell technology. Proceedings 15th ESACT Meeting*. O.-W. Merten, P. Perrin y J.B. Griffiths (eds.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Cumming, D.A. (1991) *Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications*. Glycobiology 1:115-130.
- D'Andrea, A.D.; Lodish, H.F. y Wong, G.G. (1989) *Expression cloning of the murine erythropoietin receptor*. Cell 57:277-285.
- Davis, J.M.; Arakawa, T.; Strickland, T.W. e Yphantis, D.A. (1987) *Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells*. Biochem. 26:2633-2638.
- Delhotal, B.; Lemonnier, F.; Couturier, M.; Wolfram, C.; Gautier, M. y Lemonnier, A. (1984) *Comparative use of fructose and glucose in human liver and fibroblastic cell cultures*. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant 20(9):699-706.
- Delorme, E.; Lorenzini T. y Giffin, J. (1992) *Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin*. Biochem. 1:9871-9876.
- DeRossi, C.; Bode, L.; Eklund, E.A.; Zhang, F.; Davis, J.A.; Westphal, V.; Wang, L.; Borowsky, A.D. y Freeze, H.H. (2006) *Ablation of mouse phosphomannose isomerase (Mpi) causes mannose-6-phosphate accumulation, toxicity and embryonic lethality*. J. Biol. Chem. 281(9):5916-5927.
- Derringer, G. y Suich, R. (1980) *Simultaneous optimization of several response variables*. J. Qual. Technol. 12:214-219.
- Despagne, F. y Massart, D.L. (1998). *Neural networks in multivariate calibration*. Analyst 123:157R-178R.
- deZengotita, V.M.; Abston, L.R.; Schmelzer, A.E.; Shaw, S. y Miller, W.M. (2002a) *Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality*. Biotechnol. Bioeng. 78(7):741-752.
- deZengotita, V.M.; Schmelzer, A.E. y Miller, W.M. (2002b) *Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO₂ and osmolality: intracellular pH, cell size, apoptosis and metabolism*. Biotechnol. Bioeng. 77(4):369-380.
- Dingstad, G.; Egelandsdal, B. y Naes, T. (2003) *Modeling methods for crossed mixture experiments – a case study from sausage production*. Chemometr. Intell. Lab. Syst. 66:175-190.
- Dingstad, G.; Westad, F. y Naes, T. (2004) *Three case studies illustrating the properties of ordinary and partial least squares regression in different mixture models*. Chemometr. Intell. Lab. Syst. 71:33-45.
- Dircks, C.; Williams, E.H. y Campochiaro, P.A. (1987) *High glucose concentrations inhibit protein synthesis in retinal pigment epithelium in vitro*. Exp. Eye Res. 44:951-958.
- Donnelly, M. y Scheffler, I.E. (1976) *Energy metabolism in respiration deficient and wild-type Chinese hamster fibroblasts in culture*. J. Cell. Physiol. 18:39-52.
- Doverskog, M.; Ljunggren, J.; Öhman, L. y Häggström, L. (1997) *Physiology of cultured animal cells*. J. Biotechnol. 59:103-115.
- Doyle, D. y Butler, M. (1990) *The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma*. J. Biotechnol. 15:91-100.

- Dringen, R.; Bergbauer, K.; Wiesinger, H. y Hamprecht, B. (1994) *Utilization of mannose by astroglial cells*. Neurochem. Res. 19:23-30.
- Dube, S.; Ficher, J.W. y Powell, J.S. (1988) *Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function*. J. Biol. Chem. 263:17516-17521.
- Ducommun, P.; Ruffieux, P.A.; Kadouri, A.; von Stockar, U. y Marison, I.W. (2002) *Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process*. Biotechnol. Bioeng. 77(7):838-842.
- Dunster, C.A.; Cheeseman, K.H. y Maddix, S.P. (1997) *The effect of oxidative stress on the production of the recombinant protein, interferon gamma, produced by Chinese hamster ovary cells in stirred-batch culture*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48:198-203.
- Egrie J.C.; Strickland, T.W. y Lane, J. (1986) *Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin*. Immunobiology 172:213-224.
- Egrie, J.C.; Grant, J.R.; Gillies, D.K.; Aoki, K.H. y Strickland, T.W. (1993) *The role of carbohydrate on the biological activity of erythropoietin*. Glycoconjugate J. 10(4):263.
- Egrie, J.C. y Browne, J.K. (2001) *Development and characterization of novel erithropoiesis stimulating protein (NESP)*. Nephrol. Dial. Transpl. 16(3):3-13.
- Ehrenreich, H.; Hinze-Selch, D.; Stawicki, S.; Aust, C.; Knolle-Veentjer, S.; Wilms, S.; Heinz, G.; Erdag, S.; Jahn, H.; Degner, D.; Ritzén, M.; Mohr, A.; Wagner, M.; Schneider, U.; Bohn, M.; Huber, M.; Czernik, A.; Pollmächer, T.; Maier, W.; Sirén, A.L.; Klosterkötter, J.; Falkai, P.; Rütther, E.; Aldenhoff, J.B. y Krampe, H. (2007) *Hemoglobin-independent organ protection by EPO in humans: amelioration of cognitive loss in chronic schizoprenia*. J. Am. Soc. Nephrol. 18:3-6.
- Erhe, G.; Boucher, M.; Chuprun, J.K.; Zhou, R.H.; Eckhart, A.D. y Koch, W.J. (2007) *Darbepoetin alfa, a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart*. Am. J. Physiol. Heart - C. 293:H60-H68.
- Ermonval, M.; Duvet, S.; Zonneveld, D.; Cacan, R.; Buttin, G. y Braakman, I. (2000) *Truncated N-glycans affect protein folding in the ER of CHO-derived mutant cell lines without preventing calnexin binding*. Glycobiology 10(1):77-87.
- Etcheverrigaray, M.; Amadeo, G.I.; Didier, C.; Pereira Bacci, D.A.; Cavatorta, F.A. y Kratje, R.B. (2003) *Physicochemical estimation of rhEPO potency produced in different culture systems*. En: *Animal Cell Technology meets Genomics*. F. Gòdia y M. Fussenegger (eds.), Springer Publisher, Amsterdam, The Netherlands.
- Etcheverry, T. y Ryll, T. (1998) *Mammalian cell culture process*. Patente estadounidense USP N° 5,705,364.
- European Pharmacopoeia (2007) *Erythropoietin concentrated solution – 6th Edition, Volume 2, 01/2008:1316, p. 1813-1817*.
- Ey, P.L.; Prowse, S.J. y Jenkin, C.R. (1978) *Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A Sepharose*. Biochem. 15:429-436.
- Fandrey, J. (2004) *Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression*. Am. J. Physiol. Reg. – I. 286(6):R977-988.
- Fawcett, J., y Scott, J. (1960) *A rapid and precise method for the determination of urea*. J. Clin. Pathol. 13:156-159.
- FDA, U.S. Food and Drug Administration (1997) *Points to consider in manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use* [on line]. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets> (búsqueda por nombre del artículo).
- Ferwerda, W.; Blok, C.M. y van Rinsum, J. (1983) *Synthesis of N-acetylneuraminic acid and of CMP-N-acetylneuraminic acid in the rat liver cell*. Biochem. J. 216:87-92.
- Fieder, J.; Schorn, P.; Bux, R. y Noé, W. (1995) *Increase of productivity in recombinant CHO cells by enhanced glucose levels*. En: *Animal cell technology: Developments towards the 21st century*. E.C. Beuvery, J.B. Griffiths y W.P. Zeijlemaker (eds.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

- Fiedler, K. y Simmons, K. (1995) *The role of N-glycans in the secretory pathway*. Cell 81:309-312.
- Fitzpatrick, L.; Jenkins, H.A. y Butler, M. (1993) *Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture*. Appl. Biochem. Biotechnol. 43:93-116.
- Freshney, R. (1994) *Maintenance of the culture: cell lines*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic techniques*. Wiley-Liss Inc., New Jersey, EE.UU.
- Fukuda, M.N.; Sasaki, H.; Lopez, L. y Fukuda, M. (1989) *Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates*. Blood 73:84-89.
- Fukuta, K.; Yokomatsu, T.; Abe, R.; Asanagi, M. y Makino, T. (2000) *Genetic engineering of CHO cells producing human interferon-gamma by transfection of sialyltransferases*. Glycoconjugate J. 17(12):895-904.
- Furtado, N.A.J.C.; Duarte, M.C.T.; de Albuquerque, S.; Mello, C. y Bastos, J.K.. (2005) *Improvement of trypanocidal metabolites production by Aspergillus fumigatus using neural networks*. Microbiol. Res. 160:141-148.
- Furuhashi, K. y Takagi, M. (1984) *Optimization of a medium for the production of 1,2-epoxytetradecane by Nocardia corallina B-276*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:6-9.
- García Pérez, H.M. (2000) *Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia*. UNIV DIAG 1(2):31-41.
- Garcia-Perez, A.; Martin, B.; Murphy, H.R.; Uchida, S.; Murer, H.; Cowley Jr, B.D.; Handler, J.S. y Burg, M.B. (1989) *Molecular cloning of cDNA coding for kidney aldose reductase. Regulation of specific mRNA accumulation by NaCl-mediated osmotic stress*. J. Biol. Chem. 264(28):16815-16821.
- Gawlitzeck, M.; Valley, U.; Nimtz, M.; Wagner, R. y Conradt, H.S. (1995) *Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions*. J. Biotechnol. 42:117-131.
- Gawlitzeck, M.; Valley, U. y Wagner, R. (1998) *Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells*. Biotechnol. Bioeng. 57(5):518-528.
- Gebert, C.A. y Gray, P.P. (1995) *Expression of FSH in CHO cells. II. Stimulation of hFSH expression levels by defined medium supplements*. Cytotechnology 17:13-19.
- Genzel, Y.; Ritter, J.B.; König, S.; Alt, R. y Reichl, U. (2005) *Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells*. Biotechnol. Prog. 21(1):58-69.
- Gershman, H. y Robbins, P.W. (1981) *Transitory effects of glucose starvation on the synthesis of dolichol-linked oligosaccharides in mammalian cells*. J. Biol. Chem. 256:7774-7780.
- Ghezzi, P. y Brines, M. (2004) *Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine*. Cell Death Differ. 11(1):S37-44.
- Glacken, M.W.; Fleischaker, R.J. y Sinskey, A.J. (1986) *Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells*. Biotechnol. Bioeng. 28:1376-1389.
- Glacken, M.W. (1988) *Catabolic control of mammalian cell culture*. Bio/Technology 6:1941-1950.
- Glassy, M.C.; Tharanka, J.P. y Chau, P.C. (1988) *Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production*. Biotechnol. Bioeng. 32:1015-1028.
- Goicoechea, H.C. y Olivieri, A.C. (2007) *Métodos de calibración multivariada para modelar respuestas no lineales respecto de la concentración del analito*. En: *La Calibración en Química Analítica*. Ed. UNL, Santa Fe, Argentina. En prensa.
- González-Mateos, F.; Gómez, M.E.; García Salguero, L.; Sánchez, V. y Aragón, J.J. (1993) *Inhibition of glycolysis by amino acids in ascites tumor cells*. J. Biol. Chem. 268:7809-7817.
- Goochee, C.F. y Monica, T. (1990) *Environmental effects on protein glycosilation*. Bio/Technology 8:421-427.

- Goochee, C.F.; Gramer, M.J.; Andersen, D.C.; Bahr, J.B. y Rasmussen, J.R. (1991) *The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties*. Biotechnol. 9:1347-1355.
- Goochee, C.F. (1992) *Bioprocess factors affecting glycoprotein oligosaccharide structure*. Dev. Biol. Stand. 76:95-104.
- Goto, M.; Akai, K.; Murakami, A.; Hashimoto, C.; Tsuda, E.; Ueda, M.; Kawanishi, G.; Ishimoto, A.; Chiba, H. y Sasaki, R. (1988) *Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein*. Bio/Technology 6:67-71.
- Gould, G.W.; Thomas, H.M.; Jess, T.J. y Bell, G.I. (1991) *Expression of human glucose transporters in Xenopus oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms*. Biochem. 30(21):5139-5145.
- Grammatikos, S.I.; Valley, U.; Nimtz, M.; Conradt, H.S. y Wagner, R. (1998) *Intracellular UDP-N-acetylhexosamine pool affects N-glycan complexity: a mechanism of ammonium action on protein glycosylation*. Biotechnol. Prog. 14:410-419.
- Griffiths, J.B. (1986). *Scaling-up of animal cell cultures*. En: *Animal Cell Culture*. R. Freshney (ed.), IRL Press Oxford, Washington, EE.UU.
- Griffiths, J.B. (1992) *Animal cell culture processes – batch or continuous?* J. Biotechnol. 22:21-30.
- Gu, X. y Wang, D.I.C. (1998) *Improvement of interferon- γ sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine*. Biotechnol. Bioeng. 58(6):642-648.
- Gustafsson, B. (1990) *Cryopreservation of hybridomas*. En: *Methods in Molecular Biology. Animal Cell Culture*. J. Pollard y J. Walker (eds.), The Humana Press, Inc., Clifton, EE.UU.
- Hägström, L. (1991) *Energetics of glutaminolysis: a theoretical evaluation*. En: *Production of biologicals from animal cells in culture*. R.E. Spier, J.B. Griffiths y B. Meignier (eds.), Butterworth-Heinemann Publishers, Stoneham, EE.UU.
- Han, K.K. y Martinage, A. (1991) *Post-translational chemical modification(s) of proteins*. Int. J. Biochem. Cell B. 24:19-28.
- Han, K.K. y Martinage, A. (1992) *Possible relationship between coding recognition amino acid sequence motif of residue(s) and post-translational chemical modification of proteins*. Int. J. Biochem. Cell B. 24:1349-1363.
- Han, K.K. y Martinage, A. (1993) *Post-translational chemical modifications of proteins III. Current developments in analytical procedures of identification and quantitation of post-translational chemically modified amino acid(s) and its derivatives*. Int. J. Biochem. Cell B. 25:957-970.
- Handa-Corrigan, A.; Emery, E.N. y Spier, R.E. (1987) *On the evaluation of gas-liquid interfacial effects on the hybridoma viability in bubble column reactors*. Dev. Biol. Stand. 66:241-253.
- Hansen, H. y Emborg, C. (1994) *Influence of ammonium on growth, metabolism and productivity of a continuous suspension Chinese hamster ovary cell culture*. Biotechnol. Prog. 10:121-124.
- Harris, L.W. y Griffiths, J.B. (1977) *Relative effects of cooling and warming rates on mammalian cells during the freeze-thaw cycle*. Cryobiology 14:662-669.
- Hart, G.W. (1992) *Glycosylation*. Curr. Opin. Cell Biol. 4:1017-1023.
- Hasegawa, T. (1996) *History and evolution of culture maintenance and preservation techniques*. En: *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. J. Hunter-Cevera. y A. Belt (eds.), Academic Press, Inc., San Diego, EE.UU.
- Hassell, T.E.; Gleave, S. y Butler, M. (1991) *Growth inhibition in animal cell culture: the effect of lactate and ammonia*. Appl. Biochem. Biotechnol. 30:29-41.
- Hauser, H. (1997) *Heterologous expression of genes in mammalian cells*. En: *Mammalian cell biotechnology in protein production*. H. Hauser y R. Wagner (eds.), Walter de Gruyter, Berlín, Alemania.
- Hayter, P.M.; Curling, E.M.A.; Gould, M.L.; Baines, A.J.; Jenkins, N.; Salmon, I.; Strange, P.G. y Bull, A.T. (1993) *The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant*

- interferon- γ production in glucose-limited chemostat culture.* Biotechnol. Bioeng. 42:1077-1085.
- Hearing, J.; Hunter, E.; Rodgers, L.; Gething, M.J. y Sambrook, J. (1989) *Isolation of Chinese hamster ovary cell lines temperature conditional for the cell-surface expression of integral membrane glycoproteins.* J. Cell Biol. 108:339-353.
- Helenius, A. (1994) *How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum.* Mol. Biol. Cell. 5:253-265.
- Hendrick, V.; Winnepeninckx, P.; Abdelkafi, C.; Vandeputte, O.; Cherlet, M.; Marique, T.; Renemann, G.; Loa, A.; Kretzmer, G. y Werenne, J. (2001) *Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis.* Cytotechnology 36:71-83.
- Huang, Y.; Li, S.; Dremel, B.; Bilitewski, U. y Schmid, R. (1991) *On-line determination of glucose concentration throughout animal cell cultures based on chemiluminescent detection of hydrogen peroxide coupled with flow-injection analysis.* J. Biotechnol. 18:161-162.
- Irani, N.; Wirth, M.; van der Heuvel, J. y Wagner, R. (1999) *Improvement of the primary metabolism of cell culture by introducing a new cytoplasmic carboxylase reaction.* Biotechnol. Bioeng. 66:238-246.
- Irani, N.; Beccaria, A.J. y Wagner, R. (2002) *Expression of recombinant cytoplasmatic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells.* J. Biotechnol. 93:269-282.
- Ito, M. y McLimans, W. (1981) *Ammonium inhibition of interferon synthesis.* Cell Biol. Int. Rep. 5:661-666.
- Jacobs, K.; Shoemaker, C.; Rudersdorf, R.; Neill, S.D.; Kaufman, R.J.; Mufson, A.; Seehra, J.; Jones, S.S.; Hewick, R. y Fritsch, E.F.; (1985) *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin.* Nature 313(6005):806-810.
- James, D.C.; Freedman, R.B.; Hoare, M.; Ogonah, O.W.; Rooney, B.C.; Larionov, O.A.; Dobrovolsky, V.N.; Lagutin, O.V. y Jenkins, N. (1995) *N-glycosylation of recombinant human interferon-gamma produced in different animal expression systems.* Bio/Technology 13:592-596.
- Jan, D.C.; Petch, D.A.; Huzel, N. y Butler, M. (1997) *The effect of dissolved oxygen on the metabolic profile of a murine hybridoma grown in serum-free medium in continuous cultures.* Biotechnol. Bioeng. 54:153-164.
- Jelkmann, W. y Hellwig, B. (2001) *Biology of erythropoietin.* Adv. Exp. Med. Biol. 502:169-187.
- Jelkmann, W. (2003) *Erythropoietin.* J. Endocrinol. Invest. 26(9):832-837.
- Jenkins, N. y Curling, E. (1994) *Glycosilation of recombinant proteins: Problems and prospects.* Enzyme Microb. Technol. 16:354-364.
- Jenkins, N.; Castro, P.M.; Menon, S.; Ison, A. y Bull, A.T. (1994) *Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon- γ expressed in CHO cells.* Cytotechnology 15:209-215.
- Jin, S. ; Ye, K. ; Shimizu, K. y Nikawa, J. (1996) *Application of artificial neural network and fuzzy control for fed-batch cultivation of recombinant Saccharomyces cerevisiae.* J. Ferm. Bioeng. 81(5):412-421.
- Jobses, I.; Martens, D. y Tramper, J. (1991) *Lethal events during gas sparging in animal cell culture.* Biotechnol. Bioeng. 37:484-490.
- Jones, K.H. y Senft, J.A. (1985) *An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide.* J. Histochem. Cytochem. 33:77-79.
- Kaltenbach, J.P.; Kaltenbach, M.H. y Lyons, W.B. (1958) *Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells.* Exp. Cell. Res. 15:112-117.
- Kasabov, N.K. (1998) *Foundation of neural networks, fuzzy systems and knowledge engineering.* The MIT PRESS, Cambridge, Reino Unido.

- Keen, M.J., y Rapson, N.T. (1995) *Development of a serum-free medium for the large scale production of recombinant protein from Chinese hamster ovary cell line*. Cytotechnology 17:153-163.
- Kennedy, M. y Krouse, D. (1999) *Strategies for improving fermentation medium performance: a review*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 23(6):456-475.
- Kim, E.; Kim, N. y Lee, G. (1999) *Development of a serum-free medium for dihydrofolate reductase-deficient Chinese hamster ovary cells (DG44) using a statistical design: beneficial effect of weaning of cells*. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal 35:178-182.
- Kobata, A. (1992) *Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins*. Eur. J. Biochem. 209:483-501.
- Kobayashi, T.; Yanase, H.; Iwanaga, T.; Sasaki, R. y Nagao, M. (2002) *Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs*. Biochem. Bioph. Res. Co. 296(1):145-151.
- Koll, H.; Sellinger, K.H.; Haselbeck, A. y Burg, J. (2000) *Erythropoietin with high specific activity*. Patente Canadiense N° CA 2,309,810.
- Kornfeld, R. y Kornfeld, S. (1985) *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. Annu. Rev. Biochem. 54:631-664.
- Kovar, J. y Franek, F. (1986) *Serum-free medium for hybridoma and parental myeloma cell cultivation*. Method. Enzymol. 121:277-292.
- Kowalski, S.M.; Cornell, J.A. y Vining, G.G. (2000) *A new model and class of designs for mixture experiments with process variables*. Commun. Stat.- Theor. M. 29:2255-2280.
- Kowalski, S.M.; Cornell, J.A. y Vining, G.G. (2002) *Split-plot designs and estimation methods for mixture experiments with process variables*. Technometrics 44(1):72-79
- Krantz, S.B. (1991) *Erythropoietin*. Blood 77:419-434.
- Kratje, R. y Wagner, R. (1992) *Evaluation of the production of recombinant human interleukin-2 in a fluidized bed bioreactor*. Biotechnol. Bioeng. 39:233-242.
- Kristo, E.; Biliaderis, C.G. y Tzanetakis, N. (2003) *Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology*. Food Chem. 83:437-446.
- Kröse, B. y van der Smagt, P. (1996) *An introduction to neural networks*. University of Amsterdam Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Krug, E.; Zweibaum, A.; Schulz-Holstege, C. y Keppler, D. (1984) *D-glucosamine-induced changes in nucleotide metabolism and growth of colon carcinoma cells in culture*. Biochem. J. 217:701-708.
- Kunkel, J.P.; Jan, D.C.; Jamieson, J.C. y Butler, M. (1998) *Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody*. J. Biotechnol. 62:55-71.
- Kurano, N.; Leist, C.; Messi, F.; Kurano, S. y Fiechter, A. (1990) *Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products*. J. Biotechnol. 15:113-128.
- Lacombe, C. y Mayeux, P. (1998) *Biology of erythropoietin*. Haematologica 83:724-732.
- Lai, P.H.; Everett, R.; Wang, F.F.; Arakawa, T. y Goldwasser, E. (1986) *Structural characterization of human erythropoietin*. J. Biol. Chem. 261:3116-3121.
- Lamotte, D.; Eon-Duval, A.; Acerbis, G.; Distefano, G.; Monaco, L.; Soria, M.; Jenkins, N.; Engasser, J-M. y Marc, A. (1997) *Controlling the glycosylation of recombinant proteins expressed in animal cells by genetic and physiological engineering*. En: *Animal Cell Technology: From Vaccines to Genetic Medicine*. M.J.T. Carrondo, J.B. Griffiths y J.L.P. Moreira (eds.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Le Gros, G.S.; Herbert, A.G. y Watson, J.D. (1985) *The effects of sodium butyrate of lymphokine production*. Lymphokine Research 4(3):221-227.

- Lee, E.U.; Roth, J. y Paulson, J.C. (1989) *Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactosidase alpha 2,6-sialyltransferase*. J. Biol. Chem. 264:13848-13855.
- Lee, K.M. y Gilmore, D.F. (2005) *Formulation and process modelling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial wastes by novel crossed experimental design*. Process Biochem. 40:229-246.
- Leist, C.H.; Meyer, H.P. y Fiechter, A. (1990) *Minireview: Potential and problems of animal cells in suspension culture*. J. Biotechnol. 15:1-46.
- Lin, F.K.; Suggs, S.; Lin, C.H.; Browne, J.K.; Smalling, R.; Egrie, J.C.; Chen, K.K.; Fox, G.M.; Martin, F. y Stabinski, Z. (1985) *Cloning and expression of the human erythropoietin gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(22):7580-7584.
- Lipšic, E.; Schoemaker, R.G.; van der Meer, P.; Voors, A.A.; van Veldhuisen, D.J. y van Gilst, W.H. (2006) *Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia*. J. Am. Coll. Cardiol. 48:2161-2167.
- Mainwaring, D. y Wayte, J. (2005). *Cell Culture Medium*. Patente europea EP N° 20,030,718,742.
- Maiorella, B.L. (1992) *In vitro management of ammonia's effect on glycosylation of cell products through pH control*. Patente estadounidense USP N° 5,096,816.
- Marquis, C.P.; Barford, J.; Harbour, C. y Fletcher, A. (1996) *Carbohydrate and aminoacid metabolism during batch culture of a human lymphoblastoid cell line, BTSN6*. Cytotechnology 21(2):121-132.
- Marquis, C.P.; Harbour, C.; Barford, J.P. y Low, K.S. (1990) *A comparison of different culture methods for hybridoma propagation and monoclonal antibody production*. Cytotechnology 4(1):69-76.
- Marti, H.H.; Wenger, R.H.; Rivas, L.A.; Starumann, U.; Digicaylioglu, M.; Henn, V.; Yonekawa, Y.; Bauer, C. y Gassmann, M. (1996) *Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain*. Eur. J. Neurosci. 8(4):666-676.
- Martinelle, K y Häggström, L. (1993) *Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes*. J Biotechnol. 30:339-350.
- Martinelle, K.; Doverskog, M.; Jacobsson, U.; Chapman, B.; Kuchel, P. y Häggström, L. (1998) *Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: evidence from 1H/15N NMR*. Biotechnol. Bioeng. 60:508-517.
- Masuda, S.; Kobayashi, T.; Chikuma, M.; Nagao, M. y Sasaki, R. (2000) *The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner*. Am. J. Physiol. - Endoc. M. 278(6):E1038-1044.
- Matsuno, T.; Satoh, T. y Suzuki, H. (1986) *Prominent glutamine oxidation activity in mitochondria of avian transplantable hepatoma induced by MC-29 virus*. J. Cell. Physiol. 128:397-401.
- McDermott, R.C. y Butler, M. (1993) *Uptake of glutamate, not glutamine synthetase, regulates adaptation of mammalian cells to glutamine free medium*. J. Cell Sci. 104:51-58.
- McGann, L.E. (1978) *Differing actions of penetrating and no penetrating cryoprotective agents*. Cryobiology 15:382-390.
- McQueen, A. y Bailey, E. (1990a) *Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production*. Biotechnol. Bioeng. 35:1067-1077.
- McQueen, A. y Bailey, E. (1990b) *Mathematical modelling of the effect of ammonium ion on the intracellular pH of hybridoma cells*. Biotechnol. Bioeng. 35:897-907.
- Melli, G.; Keswani, S.C. y Höke, A. (2006) En: *Erythropoietin and the nervous system*. Ahmet Höke, Ed. Springer Science+Business Media, Inc. New York, EE.UU.
- Miller, W.M.; Wilke, C.R. y Blanch, H.W. (1988) *Transient response of hybridoma cells to lactate and ammonia pulses and step changes in continuous culture*. Bioprocess Eng. 3:113-122.
- Miller, W.M. y Blanch, H.W. (1991) *Regulation of Animal Cell Metabolism in Bioreactors*. En: *Animal Cell Bioreactors*, C.S. Ho y D.I.C. Wang (eds). Butterworth-Heinemann, Stoneham, EE.UU.

- Miner, K.M.; Reading, C.L. y Nicolson, G.L. (1981) *In vivo and in vitro production and detection of monoclonal antibodies to surface components on metastatic variants of murine tumor cells.* Invas. Metast. 1:158-174.
- Minh, K.L.; Klemm, K.; Abshagen, K.; Eipel, C.; Menger, M.D. y Vollmar, B. (2007) *Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin- α in acute liver failure of mice.* Am. J. Pathol. 170:1954-1963.
- Miyake, T.; Kung, C.K. y Goldwasser, E. (1977) *Purification of human erythropoietin.* J. Biol. Chem. 252(15):5558-5564.
- Mizutani, M.; Okuda, Y.; Yamaoka, T.; Tsukahara, K.; Isaka, M.; Bannai, C. y Yamashita, K. (1992) *High glucose and hyperosmolarity increase platelet-derived growth factor mRNA levels in cultured human vascular endothelial cells.* Biochem. Bioph. Res. Co. 187(2):664-669.
- Moreadith, L.W. y Lehninger, A.L. (1984) *The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria: role of mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme.* J. Biol. Chem. 259:6215-6221.
- Moreira, G.A.; Micheloud, G.A.; Beccaria, A.J. y Goicoechea, H.C. (2007) *Optimization of the Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-1 δ -endotoxins production by using experimental mixture design and artificial neural networks.* Biochem. Eng. J. 35(1):48-55.
- Moyo, S.; Gashe, B.A.; Collison, E.K. y Mpuchane, S. (2003) *Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of Kluyveromyces wickerhamii by using response surface methodology,* Int. J. Food Microbiol. 85:87-100.
- Munzert, E.; Müthing, J.; Büntemeyer, H. y Lehmann, J. (1996) *Sialidase activity in culture fluid of Chinese hamster ovary cells during batch culture and its effect on recombinant human antithrombin III integrity.* Biotechnol. Prog. 12:559-563.
- Myers, R.H. y Montgomery, D.C. (1995) *Response Surface Methodology. Process and product optimization using designed experiments.* John Wiley & Sons, Inc. (ed.), New York, EE.UU.
- Narhi, L.O.; Arakawa, T. y Aoki, K.H. (1991) *The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin.* J. Biol. Chem. 266:23022-23026.
- Neermann, J. y Wagner, R. (1996) *Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells.* J. Cell. Physiol. 166(1):152-169.
- Newland, M.; Greenfield, P. y Reid, S. (1990) *Hybridoma growth limitations: the roles of energy metabolism and ammonia production.* Cytotechnology 3:215-229.
- Ngo, T.T.; Phan, A.P.H.; Yam, F.C. y Lenhoff, H.M. (1982) *Interference in determination of ammonia with the hypochlorite-alkaline phenol method of Berthelot.* Anal. Chem. 54(1):46-49.
- Niehues, R.; Hasilik, M.; Alton, G.; Körner, C.; Schiebe-Sukumar, M.; Koch, H.G.; Zimmer, K.P.; Wu, R.; Harms, E.; Reiter, K.; von Figura, K.; Freeze, H.H.; Harms, H.K. y Marquadt, T. (1998) *Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy.* J. Clin. Invest. 101:1414-1420.
- Nimtz, M.; Martin, W.; Wray, V.; Klöppel, K-D.; Augustin, J. y Conradt, H.S. (1993) *Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells.* Eur. J. Biochem. 213:39-56.
- Nishihara, M.; Miura, T.; Miki, T.; Sakamoto, J.; Tanno, M.; Kobayashi, H.; Ikeda, Y.; Ohori, K.; Takahashi, A. y Shimamoto, K. (2006) *Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β .* Am. J. Physiol. – Heart C. 291:H748-H755.
- Ogawa, T.; Kamihira, M.; Yoshida, H.; Iijima, S. y Kobayashi, T. (1992) *Effect of dissolved oxygen concentration on monoclonal antibody production in hybridoma cell cultures.* J. Ferm. Bioeng. 74:372-378.
- Oggero Eberhardt, M.R. (2002) *Estudio del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano recombinante (rhGM-CSF) producido en diferentes sistemas huésped mediante el uso de anticuerpos monoclonales.* Tesis Doctoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

- Oh, S.K.W.; Chua, F.K.F. y Choo, A.B.H. (1995) *Intracellular responses of productive hybridomas subjected to high osmotic pressure*. Biotechnol. Bioeng. 46:525-535.
- Øyaas, K.; Ellingsen, T.E.; Dyrset, N. y Levine, D.W. (1994). *Hyperosmotic hybridoma cultures: increased monoclonal antibody production with addition of glycine betaine*. Biotechnol. Bioeng. 44:991-998.
- Ozturk, S.S y Palsson, B.O. (1990) *Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH and serum concentration*. Biotechnol. Prog. 6:121-128.
- Ozturk, S.S. y Palsson, B.O. (1991) *Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism and antibody production*. Biotechnol. Bioeng. 37:989-993.
- Ozturk, S.S.; Riley, M.R. y Palsson, B.O. (1992) *Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production*. Biotechnol. Bioeng. 27:50-66.
- Ozturk, S.S.; Jorjani, P.; Taticek, R.; Lowe, B.; Shackelford, S.; Ladehoff-Guiles, D.; Thrift, J.; Blackie, J. y Naveh, D. (1997) Kinetics of glucose metabolism and utilization of lactate in mammalian cell cultures. En: *Animal Cell Technology: From Vaccines to Genetic Medicine*. M.J.T. Carrondo, J.B. Griffiths y J.L.P. Moreira (eds.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Panda, T.; Bizeria, V.S. y Ghose, T.K. (1983) *Studies on mixed fungal culture for cellulase and hemicellulase production Part I: Optimisation of medium for the mixed culture of T. reesei D1-6 and A. wentii Pt.2804*. Biotechnol. Lett. 5:767-772.
- Panneerselvam, K. y Freeze, H.H. (1996a) *Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts*. J. Clin. Invest. 97(6):1478-1487.
- Panneerselvam, K. y Freeze, H.H. (1996b) *Mannose enters mammalian cells using a specific transporter that is insensitive to glucose*. J. Biol. Chem. 271(16):9417-9421.
- Panneerselvam, K.; Etchison, J.R. y Freeze, H.H. (1997) *Human fibroblasts prefer mannose over glucose as a source of mannose for N-glycosylation*. J. Biol. Chem. 272(37):23123-23129.
- Papoutsakis, E.T. (1991) *Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage*. Trends Biotechnol. 9:316-324.
- Paredes, C.; Sanfeliu, A.; Cardenas, F. y Gòdia, F. (1998) *Estimation of intracellular fluxes for a hybridoma cell line by material balances*. Enzyme Microb. Technol. 23:187-198.
- Parek, R.B. (1991) *Effects of glycosylation on protein function*. Curr. Opin. Cell Biol. 1:750-754.
- Park, S.-C.; Lee, S.O.; Park, M.S.; Kim, S.H.; Kim, J.H.; Song, M.-Y.; Lee, B.-K.; Ko, I.-Y. y Kang, H.-I. (2004) *Production of recombinant human hyperglycosylated erythropoietin using cell culture technology by improving sialylation*. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology 32(2):142-148.
- Park, Y.S.; Kai, K.; Iijima, S. y Kobayashi, T. (1992) *Enhanced beta-galactosidase production by high cell-density culture of recombinant Bacillus subtilis with glucose concentration control*. Biotechnol. Bioeng. 40(6):686-696.
- Paulson, J.; Ujita-Lee, E. y Weinstein, J. (1991) *Process for controlling intracellular glycosylation of proteins*. Patente estadounidense USP N° 5,047,335.
- Pels Rijcken, W.R.; Overdijk, B. y van den Eijnden, D.H. (1995) *The effect of increasing nucleotide sugar concentrations on the incorporation of sugar into glycoconjugates in rat hepatocytes*. Biochem. J. 305:865-870.
- Pereira Bacci, D.A.; Perotti, N.; Etcheverrigaray, M. y Kratje, R. (1999) *Evolution of rhEPO Production in Nunc™ Cell Factories*. 8th Internacional Scientific Congress on Medical Applications of Modern Biotechnology. La Habana, Cuba.
- Petch, D. y Butler, M. (1994) *Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization*. J. Cell. Physiol. 161:71-76.
- Phillips, H.A.; Scharer, J.M.; Bols, M.C. y Moo-Young, M. (1987) *Effect of oxygen on antibody productivity in hybridoma culture*. Biotechnol. Lett. 9:745-750.

- Piepel, G.F. (1999) *Modeling methods for mixture-of-mixtures experiments applied to a tablet formulation problem*. Pharm. Dev. Technol. 4:593-606.
- Plagemann, P.G.; Wohlhueter, R.M.; Graff, J.; Erbe, J. y Wilkie, P. (1981) *Broad specificity hexose transport system with differential mobility of loaded and empty carrier, but directional symmetry, is common property of mammalian cell lines*. J. Biol. Chem. 256:2835-2842.
- Pollard, J. (1990) *Basic cell culture*. En: *Methods in Molecular Biology. Animal Cell Culture*. J. Pollard y J. Walker (eds.), The Humana Press, Inc., Clifton, EE.UU.
- Pouysségur, J.; Willingham, M. y Pastan, I. (1977) *Role of cell surface carbohydrates and proteins in cell behavior: studies on the biochemical reversion of an N-acetylglucosamine-deficient fibroblast mutant*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(1):243-247.
- Puck, T.T.; Cieciura, S.J. y Robinson, A. (1958) *Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects*. J. Exp. Med. 108:945-956.
- Pundle, A.V. y Siva Raman, H. (1994) *Medium optimization for the production of penicillin acylase and Bacillus sphaericus*. Biotechnol. Lett. 16:1041-1046.
- Ramírez, O. y Mutharasan, R. (1990) *Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures*. Biotechnol. Bioeng. 36:839-848.
- Recny, M.A.; Scoble, H.A. y Kim, Y. (1987) *Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin: Identification of des-arginine 166 erythropoietin*. J. Biol. Chem. 262:17156-17163.
- Reitzer, L.J.; Wice, B.M. y Kennell, D. (1979) *Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells*. J. Biol. Chem. 254:2669-2676.
- Renard, J.M.; Spagnoli, R.; Mazier, C.; Salles, M.F. y Mandine, E. (1988) *Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems*. Biotechnol. Lett. 10(2):91-96.
- Restelli, V. y Butler, M. (2002) *The effect of cell culture parameters on protein glycosylation*. En: *Cell Engineering. Vol. 3 Glycosylation*. M. Al-Rubeai (ed.), Kluwer Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Restelli, V.; Wang, M-D.; Huzel, N.; Ethier, M.; Perreault, H. y Butler, M. (2006) *The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells*. Biotechnol. Bioeng. 94(3):481-494.
- Reuveny, S.; Vélez, D.; MacMillan, J.D. y Miller, L. (1986) *Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors*. J. Immunol. Methods 86:53-59.
- Rush, J.S.; Panneerselvam, K.; Waechter, C.J. y Freeze, H.H. (2000) *Mannose supplementation corrects GDP-mannose deficiency in cultured fibroblasts from some patients with congenital disorders of glycosylation (CDG)*. Glycobiology 10(8):829-835.
- Russel, S. y Norvig, P. (1996) *Inteligencia artificial. Un enfoque moderno*. Ed. Prentice May Hispanoamericana S.A., Ciudad de México, México.
- Ryll, T.; Valley, U. y Wagner, R. (1994) *Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells*. Biotechnol. Bioeng. 44:184-193.
- Ryll, T.; Dutina, G.; Reyes, A.; Gunson, J.; Krummen, L. y Etcheverry, T. (2000) *Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality*. Biotechnol. Bioeng. 69:440-449.
- Ryu, J.S. y Lee, G.M. (1997) *Influence of hyperosmolar basal media on hybridoma cell growth and antibody production*. Bioprocess Biosyst. Eng. 16(6):305-310.
- Ryu, J.S. y Lee, G.M. (1999) *Application of hypoosmolar medium to fed-batch culture of hybridoma cells for improvement of culture longevity*. Biotechnol. Bioeng. 62:120-123.
- Sandstrom, C.; Miller, W.M. y Papoutsakis, E.T. (1993) *Review: serum-free media for cultures of primitive and mature hematopoietic cells*. Biotechnol. Bioeng. 62:120-123.

- Sanfeliu, A.; Paredes, C.; Cairó, J.J. y Gòdia, F. (1997) *Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture*. *Enzyme Microb. Technol.* 21:421-428.
- Sasaki, H.; Bothner, B.; Dell, A. y Fukuda, M. (1987) *Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA*. *J. Biol. Chem.* 262:12059-12076.
- Sasaki, H.; Ochi, N.; Dell, A. y Fukuda, M. (1988) *Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin: analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by fast atom bombardment mass spectrometry*. *Biochem.* 27:8618-8626.
- Sauer, L.A.; Dauchy, R.T.; Nagel, W.O. y Morris, H.P. (1980) *Mitochondrial malic enzyme: mitochondrial NAD(P)⁺ dependent malic enzyme activity and malate dependent pyruvate formation are progression linked in Morris hepatomas*. *J. Biol. Chem.* 255:3844-3848.
- Savage, A. (1997) *Glycosylation: a post-translational modification*. En: *Mammalian cell biotechnology in protein production*. H. Hauser y R. Wagner (eds.), Walter de Gruyter, Berlín, Alemania.
- Savino, R. y Ciliberto, G. (2004) *A paradigm shift for erythropoietin: no longer a specialized growth factor, but rather an all-purpose tissue-protective agent*. *Cell Death Differ.* 11:S2-S4.
- Scharfenberg, K. y Wagner, R. (1995) *A reliably strategy for the achievement of cell lines growing in protein-free medium*. En: *Animal cell technology: Developments towards the 21st century*. E.C. Beuvery, J.B. Griffiths y W.P. Zeijlemaker (eds.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Schatz, S.M.; Kerschbaumer, R.J.; Gerstenbauer, G.; Kral, M.; Dorner, F. y Scheiflinger, M. (2003) *Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature*. *Biotechnol. Bioeng.* 84:433-438.
- Scheffé, H. (1958) *Experiments with mixtures*. *J. Roy. Stat. Soc.* B20:344-360.
- Scheffé, H. (1963) *Simplex-centroid design for experiments with mixtures*. *J. Roy. Stat. Soc.* B25:235-263.
- Schenkle, P.; Grabenhorst, E.; Wagner, R.; Nimtz, M. y Conradt, H.S. (1997) *Expression of human α 2,6-sialyltransferase in BHK-21 cells increases the sialylation of coexpressed human erythropoietin*. En: *Animal Cell Technology: From Vaccines to Genetic Medicine*. M.J.T. Carrondo, J.B. Griffiths y J.L.P. Moreira (eds.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Schneider, M.; Marison, I.W. y von Stockar, U. (1996) *Minireview: The importance of ammonia in mammalian cell culture*. *J. Biotechnol.* 46:161-185.
- Schweikart, F.; Jones, R.; Jatón, J.C. y Hughes, G.J. (1999) *Rapid structural characterisation of a murine monoclonal IgA alpha chain: heterogeneity in the oligosaccharide structures at a specific site in samples produced in different bioreactor systems*. *J. Biotechnol.* 69:191-201.
- Sheeley, D.M.; Merrill, B.M. y Taylor, L.C. (1997) *Characterization of monoclonal antibody glycosylation: comparisson of expression systems and identification of terminal alpha-linked galactose*. *Anal. Biochem.* 247:102-110.
- Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. y Ames, B.N. (1994) *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10771-10778.
- Shing, D.-J.; Kang, J.Y.; Kim, Y.U.; Yoon, J.S.; Choy, H.E.; Maeda, Y.; Kinoshita, T. y Hong, Y. (2006) *Isolation of new CHO cell mutants defective in CMP-sialic acid biosynthesis and transport*. *Mol. Cells* 22(3):343-352.
- Silveira, R.G.; Kakizono, T.; Takemoto, S.; Nishio, N. y Nagai, S. (1991) *Medium optimization by an orthogonal array design for the growth of Methanosarcina barkeri*. *J. Ferm. Bioeng.* 72:20-25.
- Sirén, A.L.; Knerlich, F.; Poser, W.; Gleiter, C.H., Bruck, W. y Ehrenreich, H. (2001) *Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain*. *Acta Neuropathol.* 101(3):271-276.
- Skehel, J.J.; Stevens, D.J. y Daniela, R.S. (1984) *A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1779-1783.

- Sowade, B.; Sowade, O.; Mocks, J.; Franke, W. y Warnke, H. (1998) *The safety of treatment with recombinant human erythropoietin in clinical use: a review of controlled studies*. Int. J. Mol. Med. 1:303-314.
- Spiegel, M. (1980) *Teoría y Problemas de Estadística*. Ed. McGraw-Hill, Ciudad de México, México.
- Spivak, J.L. y Hogans, B.B. (1989) *The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat*. Blood 73:90-99.
- Street, J.C.; Delort, A.M.; Braddock, P.S. y Brindle, K.M. (1993) *A $^1H/^{15}N$ NMR study of nitrogen metabolism in cultured mammalian cells*. Biochem. J. 291:485-492.
- Strickland, T.W. (1994) *Erythropoietin isoforms*. Patente estadounidense USP N° 5,856,298.
- Sugiura, T. (1992) *Effects of glucose on the production of recombinant protein C in mammalian cells culture*. Biotechnol. Bioeng. 39:953-959.
- Sumbilla, C.M.; Zielke, C.L.; Reich, W.D.; Ozand, P.T. y Zielke, H.R. (1981) *Comparison of the oxidation of glutamine, glucose, ketone bodies and fatty acids by human diploid fibroblasts*. Biochem. Biophys. Acta 675:301-304.
- Syed, R.S.; Reid, S.W. y Li, R.M. (1998) *Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation*. Nature 395:511-516.
- Tachibana, H. y Murakami, H. (1994) *Structure and role of oligosaccharide on antibody light chains and their modification with glycosylation-based cytotechnology*. Trends Glycosci. Glyc. 6:465-475.
- Takeuchi, M.; Takasaki, S. y Miyasaki, H. (1988) *Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells*. J. Biol. Chem. 263:3657-3663.
- Teissier, P.; Perret, B.; Latrille, E.; Barillere, J.M. y Corrieu, G. (1997) *A hybrid recurrent neural network model for yeast production monitoring and control in a wine base medium*. J. Biotechnol. 55(3):157-169.
- Tey, B.T.; Singh, R.P.; Piredda, L.; Piacentini, M. y Al-Rubeai, M. (2000) *Influence of bcl-2 on cell death during the cultivation of a Chinese hamster ovary cell line expressing a chimeric antibody*. Biotechnol. Bioeng. 68(1):31-43.
- Thiel, T.; Bramble, J. y Rogers, S. (1989) *Optimum conditions for growth of cyanobacteria on solid media*. FEMS Microbiol. Lett. 61:27-32.
- Thorens, B. y Vassalli, P. (1986) *Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without effecting secretion*. Nature 321:618-620.
- Tokashiki, M. y Yokoyama, S. (1997) *Biorreactors design for animal cells*. En: *Mammalian cell biotechnology in protein production*. H. Hauser y R. Wagner (eds.), Walter de Gruyter, Berlín, Alemania.
- Tomeczkowski, J.; Ludwig, A. y Kretzmer, G. (1993) *Effect of cholesterol addition on growth kinetic and shear stress sensitivity of adherent mammalian cells*. Enzyme Microb. Technol. 15:849-853.
- Trisch, G.L. y Moore, G.E. (1962) *Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media*. Exp. Cell. Res. 28:360-364.
- Tsao, E.I.; Bohn, M.A.; Numswan, V.; Omstread, D.R. y Munster, M.J. (1992) *Effects of heat shock on the production of human erythropoietin from recombinant CHO cells*. Biotechnol. Bioeng. 40:1190-1196.
- Tsao, Y.S.; Cardoso, A.G.; Condon, R.G.; Voloch, M.; Lio, P.; Lagos, J.C.; Kearns, B.G. y Liu, Z. (2005) *Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism*. J. Biotechnol. 118(3):316-327.
- Tsuda, E.; Goto, M. y Murakami, A. (1988) *Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins*. Biochem. 27:5646-5654.

- Tully, T.P.; Bergum, J.S.; Schwarz, S.R.; Durand, S.C.; Howell, J.M.; Patel, R.N. y Cino, P.M. (2006) *Improvement of sordarin production through process optimization: combining traditional approaches with DOE*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34(3):193-202.
- Turco, S.J. (1980) *Modification of oligosaccharide-lipid synthesis and protein glycosilation in glucose-deprived cells*. Arch. Biochem. Biophys. 205:330-339.
- Tyo, M.A. y Spier, R.E. (1987) *Review: Dense cultures of animal cells at the industrial scale*. Enzyme. Microb. Technol. 9:514-520.
- Urlaub, G.; Mitchell, P.J.; Kas, E.; Chasin, L.A.; Funanage, V.L.; Myoda, T.T. y Hamlin, J. (1986) *Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions*. Somatic Cell and Molecular Genetics 12(6):555-666
- Vaidya, R.; Vyas, P. y Chhatpar, H.S. (2003) *Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by Alcaligenes xylosoxydans*. Enzyme Microb. Technol. 33:92-96.
- Valley, U.; Nimtz, M.; Conradt, H.S. y Wagner, R. (1999) *Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-acetylhexosamines and into carbohydrate structures in glycoproteins*. Biotechnol. Bioeng 64:401-417.
- Varki, A. (1993) *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology 3:97-130.
- Vriezen, N.; Romein, B.; Luyben, K. y van Dijken, J.P. (1997) *Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in suspension culture*. Biotechnol. Bioeng. 54(3):272-286.
- Wagner, A.; Marc, A.; Engasser, J.M. y Einsele, A. (1991) *Growth and metabolism of human tumor kidney cells on galactose and glucose*. Cytotechnology 7(1):7-13.
- Wagner, R.; Ryll, T.; Krafft, H. y Lehmann, J. (1988) *Variation of aminoacid concentrations in the medium of HU- β IFN and HU IL-2 producing cell lines*. Cytotechnology 1:145-150.
- Wagner, R. (1997) *Biological aspects of animal cells*. En: *Mammalian cell biotechnology in protein production*. H. Hauser y R. Wagner (eds.), Walter de Gruyter, Berlín, Alemania.
- Watson, E.; Shah, B.; Leiderman, L.; Hsu, Y-R.; Karkare, S.; Lu, H.S. y Lin, F-K. (1994) *Comparison of N-linked oligosaccharides of recombinant human tissue kallikrein produced by Chinese hamster ovary cells on microcarrier beads and in serum-free suspension culture*. Biotechnol. Prog. 10:39-44.
- Weibe, M.E.; Becker, F.; Lazar, R.; May, L.; Casto, B.; Fautz, C.; Garnick, R.; Miller, C.; Masover, G.; Bergman, D. y Lubiniecki, A.S. (1989) *A multifaceted approach to assure that recombinant t-PA is free of adventitious virus*. En: *Advances in animal cell biology and technology for bioprocess*. R.E. Spier; J.B. Griffiths; P. Stephene y C. Crooy (eds.), Butterworth-Heinemann Publishers, Stoneham, EE.UU.
- White, M.D., Shalita, Z.P., Marcus, D. y Reuveny, S. (1990) En: *Biologicals from recombinant microorganisms and animal cells: production and recovery*. M.D. White, S. Reuveny y A. Shafferman (eds.), 34th. Oholo Conference, Eilat, Israel.
- Whitlock, C. y Müller-Sieburg, C. (1990) *Long-term B lymphoid cultures from murine bone-marrow. Establishment and cloning by using stromal cell line AC 6.21*. En: *Methods in Molecular Biology. Animal Cell Culture*. J. Pollard y J. Walker (eds.), The Humana Press Inc., Clifton, EE.UU.
- Wilkinson, R.F.; Ming, R.; Anderson, B.; Bunch, T.D. y White, K.L. (1996) *The use of neural networks in developing novel embryo culture media-formulations*. Theriogenology 45(1):41-49.
- Williamson, J.R. y Cooper, R.H. (1980) *Regulation of citric acid cycle in mammalian systems*. FEBS Lett. 117:K73-K85.
- Wittwer, A.J. y Howard, S.C. (1990) *Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain to two-chain tissue-type plasminogen activator by plasmin*. Biochem. 29:4175-4180.

- Wojchowski, D.M.; Gregory, R.C.; Millar, C.P.; Pandit, A.K. y Pircher, T.J. (1999) *Signal transduction in the erythropoietin receptor system*. Exp. Cell Res. 253(1):143-156.
- Wolf, H.; Scharfenberg, K. y Wagner, R. (1993) *Verfahren zur Herstellung von Aktivimpfstoff gegen Epstein-Barr-Virus-Infektionen*. Patente Alemana DP N° 43 13 620.6.
- Wong, N.S.; Yap, M.G. y Wang, D.I.C. (2006) *Enhancing recombinant glycoprotein sialylation through CMP-sialic acid transporter over expression in Chinese hamster ovary cells*. Biotechnol. Bioeng. 93(5):1005-1016.
- Wu, Q.-L.; Chen, T.; Gan, Y.; Chen, X. y Zhao, X.-M. (2007) *Optimization of riboflavin production by recombinant Bacillus subtilis RH44 using statistical designs*. App. Microbiol. Biotechnol. 76(4):783-794.
- Xie, L. y Wang, D.I.C. (1994) *Stoichiometric analysis of animal cell growth and its applications in medium design*. Biotechnol. Bioeng. 43(11):1164-1174.
- Yang, M. y Butler, M. (2000a) *Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production and glycosylation*. Biotechnol. Bioeng. 68(4):370-380.
- Yang, M. y Butler, M. (2000b) *Enhanced erythropoietin heterogeneity in a CHO culture is caused by proteolytic degradation and can be eliminated by a high glutamine level*. Cytotechnology 34:83-99.
- Yang, M. y Butler, M. (2000c) *Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture*. Biotechnol. Prog. 16:751-759.
- Yang, M. y Butler, M. (2002) *Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms*. Biotechnol. Prog. 18(1):129-138.
- Yoon, S.K.; Song, J.Y. y Lee, G.M. (2003a) *Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells*. Biotechnol. Bioeng. 82:289-298.
- Yoon, S.K.; Kim, S.H. y Lee, G.M. (2003b) *Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells*. Biotechnol. Prog. 19(4):1383-1386.
- Yoon, S.K.; Choi, S.L.; Song, J.L. y Lee, G.M. (2005) *Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese Hamster Ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 °C*. Biotechnol. Bioeng. 89(3):345-356.
- Yuhas, J.M.; Toya, R.E. y Pazmino, N.H. (1974) *Neuraminidase and cell viability: failure to detect cytotoxic effects with dye-exclusion techniques*. J. Nat. Cancer Inst. 53(2):465-468.
- Zang, M.; Trautmann, H.; Gandor, C.; Messi, F.; Asselbergs, F.; Leist, C.; Fiechter, A. y Reiser, J. (1995) *Production of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using a protein-free cell culture medium*. Bio/Technology 13:389-392.
- Zanghi, J.A.; Schmelzer, A.E.; Mendoza, T.P.; Knop, R.H. y Miller, W.M. (1999) *Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO₂ or pH*. Biotechnol. Bioeng. 65:182-191.
- Zenclussen, M.L. (2002) *Caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales anti-eritropoyetina humana recombinante*. Tesina de Licenciatura, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Zhi, W.; Song, J. y Ouyang, F. (2005) *Application of response surface methodology to the modelling of α -amylase purification by aqueous two-phase systems*. J. Biotechnol. 118(2):157-165.
- Zhou, W.; Rehm, J. y Hu, W.S. (1995) *High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding*. Biotechnol. Bioeng. 46:579-587.
- Zhu, M.M.; Goyal, A.; Rank, D.L.; Gupta, S.K.; Vanden Boom, T. y Lee, S.S. (2005) *Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study*. Biotechnol. Prog. 21(1):70-77.

-
- Zielke, H.R.; Sumbilla, C.M. y Sevdalian, D.S. (1980) *Lactate: a major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts*. J. Cell Physiol. 104:433-441.
- Zielke, H.R.; Zielke, C.L. y Ozand, P.T. (1984) *Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells*. Fed. Proc. 43:121-125.
- Zupan, J. y Gasteiger, J. (1999) *Neural networks in chemistry and drug design*. Ed. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.

LIC. CAROLINE DIDIER

DR. RICARDO KRATJE

DRA. MARINA ETCHEVERRIGARAY