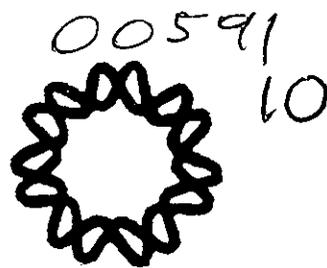




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



2 94475

**EL POTENCIAL DE OXIDO-REDUCCION:
IMPLICACIONES Y EFECTOS EN EL CULTIVO DE
CELULAS DE EUCARIOTES SUPERIORES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

ING. BT. ANGELICA MENESES ACOSTA

CUERNAVACA, MORELOS

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos de Posgrado (DGEP-UNAM), del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) a través del proyecto 202349, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 93820 y del proyecto 25164-B y, del Instituto Politécnico Nacional a través de la beca de Superación del Personal Académico.

A la memoria de Eduardo

Mil gracias por enseñarme el preciado valor de la
amistad y del amor verdaderos

Dios te bendiga dondequiera que estés

A Dara Ximena

La nueva Luz que le da sentido y esperanza a mi vida

A mis padres y hermano

Por existir, por su apoyo incondicional y por estar
conmigo en todo momento

Dedicatorias:

A Dios, por todas sus bendiciones y por permitirme ver la luz día con día.

A mis padres, por su amor, comprensión, ayuda incondicional y sobretodo sus enseñanzas sobre la vida.

A mi hermano Armando por todo su cariño, amistad y ayuda.

A mis abuelos por toda la experiencia de vida transmitida.

A las familias Meneses y Acosta, gracias a todos mis tios, primos y sobrinos por confiar en mí y por brindarme la mano siempre que la he necesitado.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez, mi tutor, por todas sus enseñanzas y su ejemplo de dedicación y trabajo. Gracias por sus consejos y por su apoyo moral en cada una de las etapas que viví como su estudiante.

A mis grandes amigos: Jenny, Laura Montero, Edith, Vicky, Rosaura, Sol, Toño Serrato, Angie O., Monserrat, José Manuel, Vera, Rafael, Enrique Pacheco y Mayela por estar conmigo en las buenas y en las malas, por enseñarme el valor de la verdadera amistad.

A mis amigos del grupo OTR: Ponchito, Laura, Toño de León, Claudia Berdugo, Francisco, José Luis, Miranda, Sandino, Edgar, Rolando, Vanessa, Hilda, Nancy y Karin por los buenos ratos compartidos y su ayuda en todo momento.

A todos mis compañeros del laboratorio Galindo-OTR. En especial a Mauricio, Celia, Mainul y Toño Rocha.

A mis amigos y compañeros de la UPIBI-IPN. En especial, a la memoria de Juan Manuel Vivero por todo lo enseñado, sus consejos y su guía; espero no haberte fallado, amigo.

Agradecimientos:

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, por haberme aceptado en su grupo y darme la confianza para desarrollar este proyecto.

A mis sinodales, los Doctores Alejandro Alagón y Horacio Merchant, por sus acertados comentarios y su ayuda en el desarrollo del proyecto.

A los miembros del Jurado por sus valiosos comentarios y por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis:

Dr. Lourival Domingos Possani Postay
Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich
Dra. Paulina Balbás Díez-Barroso
Dr. Luis Covarrubias Robles
Dr. Marco Antonio Villanueva
Dr. Mario Soberón Chávez
Dr. Enrique Galindo Fentanes

A Alfonso Gómez, Nancy Osorio y Karin Levy por su apoyo técnico y administrativo.

Al Dr. Jorge Reyes Esparza por su ayuda, comentarios y enseñanzas.

I N D I C E

	Página
Indice de Figuras	v
Indice de Tablas	viii
Nomenclatura	ix
Resumen	1
Abstract	4
I. Introducción	7
II. Antecedentes	10
II.1 El potencial de óxido-reducción	10
II.2. Medición del potencial de oxido-reducción	12
II.3. Eventos celulares dependientes del Potencial Redox	14
<i>II.3.1. Generación de especies reactivas de oxígeno</i>	14
<i>II.3.2. Protección celular contra los radicales libres</i>	16
<i>II.3.3. Reducción del ambiente por las células</i>	17
<i>II.3.4. Apoptosis</i>	19
II.4. Diferentes aplicaciones de la manipulación del potencial redox en biotecnología	20
<i>II.4.1. Plegamiento de proteínas</i>	20
<i>II.4.2. Biorremediación</i>	22
<i>II.4.3. Fermentaciones microbianas</i>	23
<i>II.4.4. Cultivo de células de eucariotes superiores</i>	25
<i>II.4.5 Control del PRC</i>	27
II.5. Aplicaciones clínicas del potencial redox	28
III. Objetivos	30
III.1. Objetivo general	30
III.2. Objetivos específicos	30

IV. Materiales y Métodos	31
IV.1. Línea celular	31
IV.2. Medio de cultivo	31
IV.3. Mantenimiento de la línea celular	32
<i>IV.3.1. Congelación de células</i>	32
<i>IV.3.2. Descongelación de células</i>	32
<i>IV.3.3. Inóculo</i>	33
IV.4. Cultivos estáticos por lote con adición de antioxidantes	33
IV.5. Cultivos en Biorreactor	34
<i>IV.5.1. Sistema de control y adquisición de datos para oxígeno disuelto, pH y potencial redox</i>	34
<i>IV.5.2. Cultivos con control de oxígeno disuelto y pH</i>	34
<i>IV.5.3. Cultivos con control de pH y potencial redox del cultivo</i>	35
<i>IV.5.4. Calibración del electrodo para el potencial redox de cultivo</i>	35
IV.6. Métodos analíticos	36
<i>IV.6.1. Cuantificación de la concentración, tamaño y viabilidad celular</i>	36
<i>IV.6.2. Cuantificación de anticuerpo monoclonal</i>	36
<i>IV.6.3. Determinación de la estabilidad del anticuerpo monoclonal</i>	37
<i>IV.6.4. Cuantificación de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y osmolaridad del medio de cultivo</i>	39
<i>IV.6.5. Cuantificación de amonio</i>	39
<i>IV.6.6. Cuantificación de tioles</i>	40
<i>IV.6.7. Determinación de la muerte celular programada</i>	40
<u>IV.6.7.1. Electroforesis en gel de agarosa</u>	40
<u>IV.6.7.2. Microscopía electrónica</u>	41
<u>IV.6.7.3. Tinción con colorantes fluorescentes</u>	42
<u>IV.6.7.4. Citometría de flujo</u>	43
IV.7. Consideraciones matemáticas	44
<i>IV.7.1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de producción de AcMo y velocidades específicas de consumo de nutrimentos</i>	44

IV.7.2. Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno	45
V. Resultados y discusión	46
V.1. Caracterización de líneas celulares	47
V.1.1. Cinéticas con glucosa y fructosa en hibridomas murinos BCF2	47
V.1.2. Caracterización de la muerte celular en cultivos de hibridomas y células de insecto Sf9	
Artículo:	50
Angélica Meneses-Acosta, Ronaldo Z. Mendonca, Horacio Merchant, Luis Covarrubias, Octavio T. Ramírez. (2001). Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. <i>Biotechnology and Bioengineering</i> 72: (4): 441 – 457	
V.1.3. Caracterización de hibridomas murinos que sobreexpresan el gene antiapoptótico bcl-2	68
V.1.4. Determinación de la presencia de retrovirus endógeno en la línea de hibridomas BCF2	70
V.2. Manipulación del potencial redox del cultivo (PRC)	73
V.2.1. Diseño del sistema de control del potencial redox de cultivo en biorreactor de 1L	73
V.2.1.1. <u>Sistema de control y adquisición de datos para el control del potencial redox de cultivo en biorreactores de 1L</u>	73
V.2.1.2. <u>Constantes de control para un sistema de comportamiento logarítmico</u>	73
V.2.1.3. <u>Cinéticas en biorreactor libre de células</u>	74
V.2.2. Comportamiento del PRC y correlación con el número de células viables a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto	76
V.2.3. Control retroalimentado del potencial redox en biorreactor de 1L	80

Artículo:

Meneses A., Gómez, A., Ramírez, O.T: (1999). **Feedback control of redox potential in hybridoma cell cultures.** In: Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F, editors. *Animal cell technology: products from cells, cells as products.* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 23-27.

<i>V.2.4. Efecto del control del PRC en cultivos por lote de hibridomas</i>	86
<u>V.2.4.1. En el crecimiento celular y producción de AcMo</u>	86
<u>V.2.4.2. En el metabolismo de glucosa</u>	90
<u>V.2.4.3. En el metabolismo de glutamina</u>	93
<u>V.2.4.4. En el metabolismo de tioles</u>	96
<u>V.2.4.5. En el metabolismo de oxígeno</u>	98
<u>V.2.4.6. En la muerte celular</u>	98
<i>V.2.5. Cinéticas con antioxidantes</i>	100
<u>V.2.5.1. 2-Mercaptoetanol (2-ME)</u>	102
<u>V.2.5.2. Cisteína (Cys)</u>	106
<u>V.2.5.3. Suero fetal bovino (SFB)</u>	108
<u>V.2.5.4. Glutación (GSH)</u>	111
<u>V.2.5.4. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)</u>	111
VI. Conclusiones	115
VII. Perspectivas	119
VIII. Referencias	121
APENDICES	
A. Diagrama del sistema de control y adquisición de datos	136
B. Listado del programa de control del potencial redox del cultivo	138
C. Gráficas de las cinéticas a PRC y OD controlados	144

Indice de Figuras

	Página
Figura II.1. Densidad de la corriente de intercambio	13
Figura V.1. Efecto del bicarbonato de sodio y la fructosa sobre la concentración celular de hibridomas	49
Artículo: Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures.	
Figure 1. Agarose gel electrophoresis of DNA at various culture stages	54
Figure 2. Transmission electron microscopy of viable and early death phase of Sf9 insect cells	55
Figure 3. Transmission electron microscopy of different stages of cell death and phagocytic process of cell detritus in Sf9 insect cells	56
Figure 4. Transmission electron microscopy of hybridoma cells at various culture stages	57
Figure 5. Identification of the various Sf9 insect cell populations by epifluorescence microscopy	59
Figure 6. Identification of the various Sf9 insect cell populations by confocal microscopy	59
Figure 7. Identification of the various hybridoma populations by epifluorescence microscopy	60
Figure 8. Identification of various hybridoma populations by confocal microscopy	60
Figure 9. Kinetics of apoptosis as determined by fluorescent staining	62
Figure 10. Typical DNA content histograms of Sf9 insect cells as determined by flow cytometry	62
Figure 11. Typical DNA content histograms of hybridoma insect cells as determined by flow cytometry	63
Figure 12. Kinetics of cell cycle distribution as determined by flow cytometry	63

Figure 13. Cell size distribution profiles as a function of culture age	63
Figure 14. Comparison of fluorescent staining, flow cytometry, and cell size determinations for quantifying PCD	64
Figura V.2. Cinética de un cultivo por lote de hibridomas transfectados con el gene antiapoptótico <i>bcl-2</i>	69
Figura V.3. Cinética de muerte en los hibridomas	69
Figura V.4. Presencia de virus endógeno en las células de hibridomas BCF2	72
Figura V.5. Manipulación del oxígeno disuelto para controlar el potencial redox del cultivo	75
Figura V.6. Control del potencial redox del cultivo a +90 mV por manipulación del OD	75
Figura V.7. Exactitud y precisión del control del potencial redox de cultivo desarrollado	75
Figura V.8. Comportamiento del potencial redox del cultivo en cultivos a oxígeno disuelto constante	78
Artículo: Feedback control of redox potential in hybridoma cell culture	
Figure 1. Typical behavior of CRP control	84
Figura V.9. Efecto del control del PRC en la concentración celular y la producción de AcMo.	87
Figura V.10. Efecto del control del PRC en el metabolismo de glucosa	91
Figura V.11. Efecto del control del PRC en el metabolismo de glutamina	94
Figura V.12. Efecto del control del PRC en la producción de tioles	97
Figura V.13. Efecto del control del PRC en el consumo de oxígeno	97
Figura V.14. Efecto del control del PRC en la muerte celular	101
Figura V.15. Efecto del 2-mercaptoetanol sobre la concentración de células viables en cultivos estáticos	103
Figura V.16. Efecto del 2-mercaptoetanol sobre la muerte celular a las 120 h de cultivo	103
Figura V.17. Determinación del tipo de muerte en cultivos con antioxidantes	104
Figura V.18. Efecto de antioxidantes y oxidantes sobre el potencial redox de cultivo y el pH.	105

Figura V.19. Efecto de la adición gradual de 2-ME al medio de cultivo sobre el PRC	105
Figura V.20. Efecto de la concentración de cisteína sobre el crecimiento celular	107
Figura V.21. Efecto de la cisteína sobre la muerte celular a las 170 horas de cultivo	107
Figura V.22. Efecto de la concentración de suero fetal bovino sobre el crecimiento celular	109
Figura V.23. Efecto del SFB sobre la muerte celular a las 72 h de cultivo	109
Figura V.24. Efecto de la adición de glutatión sobre el crecimiento celular	112
Figura V.25. Efecto de la adición de glutatión sobre la producción de anticuerpo monoclonal	112
Figura V.26. Efecto de la adición de 0.1 mM de peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento celular	114
Figura V.27. Efecto de la adición de 0.1 mM de peróxido de hidrógeno sobre el tamaño celular	114
Figura A.1. Diagrama del sistema de control	137

Indice de Tablas

	Página
Tabla V.1. Osmolaridad de diferentes medios de cultivo	48
Tabla V.2. Correlación entre el PRC y el número de células viables/mL en la fase exponencial de cultivos de hibridomas murinos	79
Artículo: Feedback control of redox potential in hybridoma cell culture	
Table I. Proportional control constants for controlling CRP at a fixed and predetermined value	83
Table II. Effect of CRP over kinetic parameters	84

Nomenclatura

Amp.-	Amperes.
AcMo.-	Anticuerpo monoclonal.
ADN.-	Acido desoxirribonucleico
AG.-	Aparato de Golgi.
AO.-	Naranja de acridina.
BE.-	Bromuro de etidio.
Cys.-	Cisteína.
e ⁻ .	Electrones.
E ⁰ .-	Potencial estándar del sistema a 25 °C cuando la actividad de todos los reactivos es la unidad.
Eh.-	Potencial redox referido al electrodo estándar de hidrógeno.
F.-	Constante de Faraday (9.6487 X 10 ⁴ C/mol).
f.e.m.-	Fuerza electromotriz.
Gln.-	Glutamina.
GSH .-	Glutación reducido.
GSSG .-	Glutación oxidado.
h.-	Horas.
IAP.-	Partícula intracisternal A.
mV.-	Milivoltios.
Min.-	Minutos.
n.-	Número de electrones.
OD.-	% de oxígeno disuelto.
PDI .-	Proteín-disulfuro isomerasa.
PRC.-	Potencial redox de cultivo.
PRCsp.-	Valor del PRC establecido.
PRCm.-	Valor del PRC medido.
PRI .-	Potencial redox intracelular.
q _{AcMo} .-	Velocidad específica de producción de AcMo.
q _{Amonio} .-	Velocidad específica de producción de amonio.
q _{Glucosa} .-	Velocidad específica de consumo de glucosa.
q _{Glutamina} .-	Velocidad específica de consumo de glutamina.
q _{Lactato} .-	Velocidad específica de producción de lactato.
q _{Oxígeno} .-	Velocidad específica de consumo de oxígeno.
q _{Tioles} .-	Velocidad específica de producción de tioles.
R.-	Constante de los gases (8.3143 J/K-mol).
RE.-	Retículo endoplásmico.
ROS.-	Especies reactivas de oxígeno.
SFB.-	Suero fetal bovino.
SHE .-	Electrodo Estándar de Hidrógeno.
T.-	Temperatura (°K)
TOD	Tensión de oxígeno disuelto.
V.-	Voltios.
X.-	Concentración de células viables.
Xo.-	Concentración de células viables inicial.
2-ME.-	2-mercaptoetanol.

ΔG .- Energía libre de Gibbs.
 μ .- Velocidad específica de crecimiento.

Resumen

Uno de los principales objetivos de la ingeniería de bioprocesos es mejorar las productividades de los cultivos. Por ello, se han diseñado diferentes estrategias de control sobre los parámetros del sistema {pH, oxígeno disuelto (OD), temperatura, etc.} que han permitido optimizar los sistemas de producción. Un parámetro que en general ha recibido poca atención es el potencial redox del cultivo (PRC) debido quizá a la dificultad de interpretar sus resultados y a la dependencia directa con el OD y pH. Este parámetro brinda información sobre la “actividad electrónica” presente en los cultivos y tiene gran importancia en el metabolismo celular. En algunas áreas de la biotecnología, tales como la biorremediación o las fermentaciones microbianas, el monitoreo y control del PRC está adquiriendo importancia en la identificación y eliminación de contaminantes y, para dirigir la síntesis de metabolitos, respectivamente. Sin embargo, en el cultivo de células de eucariotes superiores, el monitoreo del PRC ha tenido aplicaciones limitadas que incluyen la determinación en línea de la concentración de células viables, la discriminación entre eventos metabólicos y fallas operacionales, y la determinación de tiempos de cosecha en células de insecto, sin existir actualmente reportes que se refieran al efecto del control del PRC en tales sistemas. Por ello, se estableció como objetivo principal de este trabajo la evaluación del efecto del control del PRC a diferentes valores tanto reductores como oxidantes sobre los parámetros cinéticos y la muerte celular en cultivos por lote de hibridomas. Esto, además de brindar información del efecto del PRC, permitirá establecer novedosas estrategias de control para mejorar las productividades del cultivo.

El trabajo realizado para cumplir con este objetivo se puede dividir en dos rubros, por un lado, la caracterización de diferentes líneas celulares principalmente con respecto al tipo de muerte celular para poder identificar sus características y posteriormente determinar si el estrés oxidativo es un inductor de este tipo de muerte y, por otro lado, el establecimiento y la evaluación del control del PRC sobre la línea celular de hibridomas murinos BCF2.

La caracterización de las líneas celulares incluyó la evaluación de diferentes fuentes de carbono para disminuir la concentración de lactato, concluyendo que en este caso es mejor incrementar la capacidad amortiguadora del medio de cultivo que sustituir la fuente de carbono debido a que el crecimiento celular se ve afectado ante esta segunda estrategia. Esto se realizó con la finalidad de

permitir que el cultivo pudiera mantenerse por un mayor periodo de tiempo para poder evaluar el efecto del PRC y evitar la influencia del pH sobre el PRC. La caracterización de la muerte celular en hibridomas y en células de insecto Sf9 inducida por carencia de nutrientes, permitió establecer que en el caso de los hibridomas, se presenta el patrón típico de apoptosis, mientras que en el caso de las células de insecto Sf9, hay un patrón mixto de apoptosis y necrosis. Esta caracterización permitió dilucidar porqué en la literatura concerniente a este tema existen reportes contradictorios sobre la muerte en células Sf9 y permitió establecer las características de muerte celular que, posteriormente, fueron evaluadas cuando los cultivos fueron valorados a diferentes PRC. Asimismo, con la finalidad de explorar estrategias de biología molecular que conciernen al estrés oxidativo, se evaluó la cinética de crecimiento y de muerte en una línea de hibridomas transfectada con el gene antiapoptótico *bcl-2*. Se determinó que esta línea celular alcanza mayor concentración celular y la viabilidad del cultivo permanece alta por un mayor periodo de tiempo, además de que el tipo de muerte principal es la necrosis, aún cuando también una pequeña población muere por apoptosis. Además, dentro de las características halladas en los hibridomas utilizados como modelo, se determinó la presencia de un retrovirus endógeno (partículas tipo-A o tipo-C); lo que condujo a sugerir estudios de microscopía en aquellas líneas celulares utilizadas para la producción de agentes terapéuticos debido al riesgo que conlleva la presencia viral. Sin embargo, en el caso de este trabajo no se consideró que tuviese repercusión sobre los resultados obtenidos ya que este tipo de virus proviene quizás de los progenitores tanto mieloides como linfoides del hibridoma utilizado, por lo que siempre ha estado presente en la línea celular.

Una vez caracterizadas las líneas celulares modelo, se desarrolló un programa de control de tipo proporcional que permite mantener el PRC en valores tanto reductores como oxidantes de forma predeterminada y constante. Lo novedoso del control del PRC fue que la variable manipulada (OD) presenta un comportamiento logarítmico con respecto al PRC. Esto se ve reflejado en las ganancias del control, las cuales fueron 30 veces mayores en los cultivos oxidantes con respecto a los cultivos reductores. Es decir, en el caso de los cultivos reductores, un cambio en el OD era proporcional a un cambio en el PRC pero, en el caso de los cultivos oxidantes, fue necesario realizar cambios muy grandes en el OD para lograr pequeñas variaciones en el PRC y poder mantener constante éste último. Hasta donde sabemos, es la primera vez que se reporta en el

mundo un control de tipo proporcional para una variable con este comportamiento. Una vez obtenido y afinado el control, se evaluó el efecto del control del PRC sobre cultivos por lote de hibridomas en biorreactores de 1 L (en un rango de -133 mV hasta 90 mV). Los resultados demostraron que el PRC tiene influencia en el crecimiento celular y, por ende, en la producción de anticuerpo monoclonal (AcMo) y de tioles, sin afectar drásticamente el metabolismo de glucosa y glutamina. Esto conlleva a un mejoramiento en los rendimientos del cultivo (con respecto a los nutrimentos esenciales como son la glucosa y la glutamina) en valores altamente reductores y, a un aumento en las velocidades específicas de producción de AcMo en valores del PRC alrededor de cero mV. En la mayoría de los parámetros cinéticos se observó que un ambiente altamente oxidativo tiene un efecto negativo, incrementando las velocidades de consumo de nutrimentos y disminuyendo las velocidades de producción de AcMo. Asimismo, se observó que este ambiente causa apoptosis prematura aún en presencia de los nutrimentos esenciales. Estos resultados permiten establecer estrategias de optimización en la producción de anticuerpos monoclonales tales como el promover un alto crecimiento celular a valores reductores y posteriormente cambiar a valores oxidantes para inducir la producción de AcMo.

Por último, con la finalidad de establecer formas alternativas de manipulación del PRC, se realizaron cinéticas en cultivos estáticos utilizando diferentes antioxidantes. Los resultados mostraron que el 2-mercaptoetanol (2-ME) y la cisteína (Cys) pueden ser antioxidantes útiles en la manipulación del redox. No se observó efecto significativo en el cambio del PRC por parte del glutatión (GSH) y del suero fetal bovino (SFB). El uso de peróxido de hidrógeno, como agente oxidante, causó muerte en los cultivos por lo que se recomienda utilizar concentraciones menores que no sean letales. Sin embargo, la alternativa de manipular del PRC por medio de antioxidantes abre la posibilidad de poder mantener este parámetro constante además del OD y del pH de manera simultánea.

Las alternativas de manipulación del PRC así como los resultados hallados del efecto de este parámetro sobre las variables cinéticas y la muerte celular abren nuevas posibilidades para establecer novedosas estrategias en el cultivo de células de eucariotes superiores con el fin de incrementar las productividades de los cultivos.

Abstract

One of the main purposes in bioprocess engineering is to improve culture productivities. Because of that, different control strategies have been designed on different system parameters such as pH, dissolved oxygen, temperature, agitation, etc., that have allowed the production system optimization. A parameter that has not received enough attention has been the Culture Redox Potential (CRP), perhaps due to the difficulty in interpreting the results and its direct dependence on dissolved oxygen and pH. Such a parameter gives information about the "electronic activity" in cultures. In some biotechnological areas, such as bioremediation and microbial fermentations, monitoring and control of CRP is becoming important due to the applications in pollutant identification and elimination and, in metabolite synthesis, respectively. Nevertheless, in the animal cell culture area, the utility of CRP monitoring has been limited to determine viable cell concentration on line, to identify between metabolic events and operational failures and, to determine the harvest time in insect-cell cultures, but until now, there are no reports about CRP control on such systems. Due to this, the main objective of this work was to evaluate the effect of CRP control at different reducing and oxidative values, on the kinetic parameters and cellular death in hybridoma batch cultures. Such information will be useful in establishing novel control strategies aimed at the improvement of culture productivities.

The work carried out to develop this objective can be divided in two parts. The characterization of different cell lines and the establishment and evaluation of CRP control.

The characterization of cell lines included the evaluation of different carbon sources aimed out to diminishing the lactate concentration. When fructose was used as substitute for glucose, cell growth was affected. Accordingly, the best strategy to contend with the decreasing pH was to increase the buffer capacity of the culture medium. Characterization of the cell death process, which was induced by nutrient depletion in hybridomas and Sf9 insect cells, showed that the former cell line died by the typical apoptotic pattern, however a mixed pattern between necrosis and apoptosis was present in the latter cell line. Such a characterization explained the controversial information present in the literature about Sf9 insect cells death. In addition, growth and death kinetics were evaluated in a hybridoma cell line transfected with the antiapoptotic gene *bcl-2*. This cell line reached a higher cell concentration and culture viability

was kept longer than in the case of control cultures. The transfected cell line died mainly by necrosis although apoptosis was also present. Finally, the identification of an endogenous retrovirus in the BCF2 hybridoma cells (type-A and type-C particles) emphasize the importance of performing electron microscopy studies in all cell lines used to produce monoclonal antibodies for therapeutic applications due to the risk involved in the presence of viral genomes. Nonetheless, for the present study it was considered that viral presence did not affect the results because the virus identified comes from the myeloid and lymphoid progenitors of the hybridoma used, and has always been present in the cell line without unfavorable effects.

With respect to the control of CRP, a proportional control program that maintained CRP in reducing and oxidant values in a predetermined and constant way was developed. The novelty of CRP control was that the manipulated variable (DO) presented a logarithmic behavior with respect to CRP. This was reflected in the control gains that increased 30 times in the oxidant cultures with respect to the reducing cultures. That is, for the reducing cultures a small change in DO caused a significant change in the CRP, whereas a very large change was needed to manipulate only slightly the CRP in oxidative cultures. To our knowledge, this is the first time that such a type of control is reported in the world. Once the control was obtained, hybridoma batch cultures were evaluated at constant CRP in the range of -133 mV to 90 mV. The results showed that CRP affects cell growth as well as monoclonal antibody and thiol generation without affecting the glucose, glutamine and oxygen metabolism in a significant way. These effects were reflected in the yield improvement with respect to essential nutrients such as glucose and glutamine at reducing conditions. In addition, an increase in monoclonal antibody specific production rates was found at zero mV. An oxidative environment had a negative effect in almost all the kinetic parameters. That is, an increase in the consumption rates and a decrease in the monoclonal antibody production rates were observed. Also, this oxidative environment caused premature apoptosis even when essential nutrients are still present in the culture medium. Based on such results it is possible to establish novel optimization strategies for monoclonal antibody production. For example, it is possible to promote cell growth at reducing values and then switch to an oxidative environment once a high cell concentration has been attained an increase in the specific monoclonal antibody production rate.

Finally, another alternative to manipulate CRP, is the addition of antioxidants to the culture medium. Different antioxidants were used in static cultures showing that 2-mercaptoethanol and cysteine can be used to manipulate the CRP. Glutathion and fetal calf serum did not have a significant effect on CRP whereas hydrogen peroxide caused cell death unless supplemented at substantially lower concentrations. Manipulation of CRP by addition of exogenous oxidant or antioxidant reagents opens the possibility of maintaining CRP in bioreactors while DO and pH are also kept constant.

The different alternatives for manipulating CRP, in addition to the effect of CRP control on the kinetic variables and the cell death, opens new possibilities for establishing novel culture control strategies for increasing productivities of higher eukaryotic cell cultures.

I. Introducción

En los procesos biotecnológicos el principal interés generalmente es aumentar la productividad de los cultivos. Para ello, se han desarrollado e implementado sistemas sofisticados que permiten llevar a cabo un control óptimo sobre parámetros críticos de fermentación ó cultivo tales como son el pH, oxígeno disuelto, temperatura, velocidad de agitación, alimentación de nutrimentos, etc. Sin embargo, a pesar de que gran parte de las reacciones intracelulares son del tipo oxido-reducción y de que el potencial redox del cultivo (PRC) es un parámetro fácilmente medible, éste no ha recibido gran interés dentro del control de procesos. Lo anterior probablemente es resultado de la falta de información sobre la interrelación del potencial redox intracelular con el PRC, la complejidad de su interpretación (Harrison, 1972) y su dependencia directa con otros parámetros como son el OD y el pH. En la actualidad, dentro del área de cultivo de células animales, el monitoreo en línea de este parámetro ha permitido establecer correlaciones con respecto a la viabilidad celular (Hwang y Sinskey, 1991; Eyer y Heinzle, 1996) y la identificación de fallas en el cultivo (Higareda *et al.*, 1997), pero poco se ha estudiado acerca del efecto de su control sobre el cultivo de células animales a pesar de que en el área de biorremediación (Tremblay *et al.*, 1998; Stuart *et al.*, 1999) y en fermentaciones de microorganismos (Berovic, 1999), éste está adquiriendo importancia. El diseño de nuevas estrategias que involucren el control del PRC puede permitir mejorar las productividades del cultivo de hibridomas para la producción de anticuerpo monoclonal (AcMo).

La optimización de tecnología de hibridomas para la producción de AcMo, ha adquirido gran importancia en la actualidad debido a la creciente utilidad de los AcMo dentro de las diferentes áreas de investigación, diagnóstico y medicina. Dicha tecnología surgió en el año de 1975, cuando Kohler y Milstein describieron por primera vez la producción de cultivos de hibridomas (células resultado de la fusión de mielomas y linfocitos B) que secretan anticuerpos de una especificidad predefinida. A partir de esta demostración, la producción de anticuerpos monoclonales se ha convertido en un área de gran interés para la industria biotecnológica. En la actualidad, la producción de hibridomas a partir del uso de células de diferentes especies así como la utilización de linfocitos T para crearlos ha abierto un nuevo espectro en la producción de AcMo (Stacey, 2000).

El interés sobre los AcMo's se refleja en el hecho de que de 350 productos biológicos en desarrollo durante 1998 en Estados Unidos, 74 de ellos eran AcMo's (Birch, 2000). Estos anticuerpos han sido evaluados en el área terapéutica en enfermedades infecciosas, cáncer y en trasplantes. Las perspectivas con respecto a la producción de estos compuestos se ha incrementado notablemente con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, usada para mejorar su potencial terapéutico. Los hibridomas de roedor son los más utilizados para la producción de AcMo's para fines de investigación y diagnóstico. Sin embargo, la inmunogenicidad creada por éstos limita su aplicación en aspectos terapéuticos, principalmente cuando se requieren múltiples administraciones. Por ello, también se han creado AcMo humanos, híbridos humano-ratón (heterohibridomas) y AcMo de células linfoides humanas inmortalizadas con el virus de Epstein-Barr para hacer anticuerpos humanos naturales. Sin embargo, estos dos últimos tipos han presentado limitaciones tales como baja productividad e inestabilidad. Para subsanar estos problemas se han creado AcMo's "humanizados" de roedor por medio de la tecnología del ADN recombinante con la finalidad de reducir las reacciones inmunogénicas generadas por los AcMo de roedor, en los cuales, las regiones constantes de éstos son remplazadas por sus equivalentes "humanos".

La producción a pequeña escala de estos anticuerpos se ha realizado en tumores ascíticos en ratones o ratas en donde se alcanzan concentraciones de 10 g/L en el fluido ascítico. En cambio, la producción a gran escala se ha desarrollado en cultivos en suspensión o perfusión. Esto debido a la relativa homogeneidad de tales sistemas que permite un control más preciso del ambiente del cultivo comparado con los sistemas no-homogéneos de alta densidad celular. Los cultivos en suspensión de más de 10,000 litros de volumen de trabajo se han utilizado industrialmente para producir este tipo de compuestos (Birch, 2000).

Dada la importancia biotecnológica de la producción de AcMo's se han estudiado todos aquellos parámetros que puedan influenciar las productividades del sistema. Tales parámetros han sido el pH, el OD, la temperatura, los nutrientes y la agitación entre otros. El efecto de todos ellos en diferentes tipos de biorreactores (Ramírez, 1993) y bajo diferentes condiciones se ha evaluado sobre el crecimiento celular, la productividad del sistema, la producción de desechos tóxicos y más recientemente la muerte celular. El estudio del tipo de muerte presente en los cultivos de

hibridomas ha adquirido importancia en los últimos años dado que se ha observado que aún bajo condiciones óptimas para el desarrollo de cultivos por lote, donde los esfuerzos de corte se han reducido, las condiciones de aireación se han optimizado y el diseño del biorreactor se ha mejorado, las células siguen muriendo por un proceso controlado intracelularmente. Este proceso de muerte, denominado apoptosis, tiene características muy específicas que permiten diferenciarlo del proceso pasivo de muerte denominado necrosis. La apoptosis se desencadena bajo condiciones poco severas para el cultivo como son la carencia de nutrimentos esenciales, la falta de oxígeno y la producción de compuestos tóxicos tales como amonio. Además, se ha reportado que el estrés oxidativo puede desencadenar este tipo de muerte (Fontaine y Averill; Hart *et al.*, 1999) aún cuando a la fecha existen evidencias contradictorias sobre dicho efecto. Dada la importancia de este tipo de muerte, ha sido necesario realizar una caracterización completa en hibridomas así como en otros cultivos de importancia biotecnológica (Meneses-Acosta *et al.*, 2001). Uno de esos cultivos son las células de insecto Sf9, las cuales son utilizadas para la producción de proteínas recombinantes debido a los altos niveles de expresión que se obtienen mediante el sistema baculovirus-células de insecto.

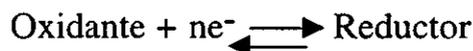
Considerando que la optimización de cultivos por lote para la producción de AcMo por medio de hibridomas es necesaria para incrementar las productividades de los sistemas y, que el PRC es un parámetro fácilmente medible y poco utilizado en el cultivo de células animales, el cual puede brindar amplia información sobre las condiciones del cultivo y el estado metabólico celular, se desarrolló este trabajo. En éste, se planteó como objetivo principal evaluar el control del PRC sobre las diferentes variables del sistema. Para ello, se desarrolló un programa computarizado de tipo proporcional que mantuviera el control del PRC en valores constantes y predeterminados. Asimismo, se evaluó el efecto de tal control en valores reductores y oxidantes sobre el crecimiento celular, la producción de AcMo, el consumo de nutrimentos, la producción de desechos tóxicos y la muerte celular. Además, se realizó la caracterización de la muerte celular en dos líneas de importancia comercial como son los hibridomas murinos y las células de insecto Sf-9, para observar si el PRC tenía efecto sobre esta muerte. Esto con la finalidad de plantear estrategias novedosas de control del PRC para la optimización de la producción de AcMo.

II. Antecedentes

II.1. El potencial de óxido-reducción

Como el nombre lo indica, la “oxidación” significa un incremento en el contenido de oxígeno del compuesto (aunque no necesariamente), mientras que la reducción implica un regreso a su estado inicial. Sin embargo, existen reacciones independientes de oxígeno que involucran de manera similar una transferencia de electrones, siendo el caso de la formación del NADH por transferencia de electrones al NAD^+ .

La definición del potencial de óxido-reducción está relacionada con un par conjugado de componentes, uno de los cuales (oxidante) puede ser reducido reversiblemente a otro (reductor) por transferencia de electrones de forma que no puede haber una oxidación sin una reducción concomitante.



Asimismo, el potencial de óxido-reducción puede ser considerado como una medida de la facilidad con la cual una sustancia absorbe o libera electrones. Por ello, la expresión de “presión electrónica” es usada algunas veces.

Ahora, para que sea posible el intercambio de electrones entre el oxidante y su reductor conjugado (par redox), es necesaria la participación de otra reacción del mismo tipo, para crear la fuerza motriz de la reacción, de tal manera que en cualquier reacción de óxido-reducción deben de estar implicados dos pares redox que difieran en su afinidad por los electrones. Uno tendrá mayor afinidad por éstos (por lo que los ganará), reduciéndose su oxidante (siendo éste el par oxidante). El otro par (par reductor), con menor afinidad por los electrones, los perderá, donándolos al oxidante del otro par, por lo que se oxidará su reductor.

Como la oxidación y la reducción implican transferencia de electrones, la reacción puede producir trabajo eléctrico, el cual será igual a su $-\Delta G$ en caso de llevarse a cabo a temperatura y presión constantes de una forma termodinámicamente reversible.

La intensidad con la que los electrones son transferidos del par reductor al par oxidante se denomina fuerza electromotriz. Esta fuerza se mide generalmente en una celda eléctrica compuesta por una semi-celda reductora y por una semi-celda oxidante. La diferencia de potencial de esta celda

eléctrica expresa la diferencia en afinidad por los electrones entre ambas semi-celdas. La afinidad que demuestra una semi-celda (par redox) por los electrones se denomina potencial de electrodo. Cuanto mayor sea esta afinidad, mayor (más positivo) será el potencial de electrodo. La máxima diferencia de potencial de una celda electroquímica se mide en voltios y es definida como la fuerza electromotriz (f.e.m.); 1 V se define como la f.e.m. que produce un flujo de electrones (1A) a través de un medio que muestra un grado estándar de resistencia a su paso (1 Ohm). Como la f.e.m. de la celda mide la diferencia entre los potenciales de electrodo de sus semi-celdas componentes, estos potenciales del electrodo también se miden en voltios (Morris, 1982).

Determinación del potencial redox.

La determinación del potencial redox es una medida potenciométrica. Prácticamente no hay corriente que fluya a través de la solución de la muestra durante la medición de este potencial ya que los cambios en la composición química debido a electrólisis son insignificantes y no hay efectos de polarización indeseable en la superficie del electrodo redox. Durante la formación de este potencial, los electrones fluyen del electrodo al sistema redox o viceversa. La separación de cargas causa un potencial en la superficie metálica que se opone a cualquier futura migración de electrones.

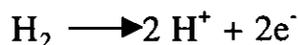
Cuando se alcanza un estado de equilibrio se presenta un balance entre la fuerza electroquímica (potencial) y las fuerzas químicas (fuerzas oxidante y reductora). El potencial redox para este equilibrio puede calcularse mediante la ecuación de Nernst:

$$E_h = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln (\text{actividad del oxidante})/(\text{actividad del reductor})$$

donde E_h es el potencial referido al electrodo estándar de hidrógeno, E^0 es el potencial estándar del sistema a 25 °C cuando la actividad de todos los reactivos es la unidad, R es la constante de los gases, T la temperatura (°K), n es el número de electrones transferidos y F la constante de Faraday (Morris, 1982).

Electrodos de referencia.

Todas las medidas potenciométricas requieren un electrodo de referencia. De hecho, éstas se miden por el potencial establecido entre el electrodo redox y el electrodo estándar de referencia, siendo la finalidad de este último dar información validada concerniente a cualquier par redox. La reacción universal de referencia es la oxidación de hidrógeno:



$$E_h = E^0 + RT/2F \ln (\text{H}^+)^2 / (\text{H}_2)$$

En el caso de gases, la presión parcial se toma como una medida de actividad. La escala en la que se miden los potenciales de electrodo se denomina escala de hidrógeno, puesto que se toma como valor cero al potencial de electrodo de la semi-celda estándar de hidrógeno. La división de la escala se da en voltios. Para esta escala de hidrógeno, se han hecho las siguientes consideraciones:

1. La semi-celda estándar de hidrógeno (potencial estándar de hidrógeno) tiene en todas las temperaturas un potencial de electrodo de 0.00 V.
2. A una semi-celda más reductora que la semi-celda estándar de hidrógeno se le atribuye un potencial de electrodo negativo, cuya magnitud mide el grado en que su afinidad por los electrones es menor que la del electrodo estándar.
3. A una semi-celda más oxidante que la semi-celda estándar de hidrógeno se le atribuye un potencial de electrodo positivo, cuya magnitud mide el grado en que su afinidad por los electrones excede a la del electrodo de estándar.

El Electrodo Estándar de Hidrógeno (SHE) (electrodo de referencia universal) consiste en una hoja metálica de platino cubierta con platino, sobre el cual fluye hidrógeno a la presión de 1 bar inmerso en una solución que contiene 1 mol/L de iones hidrógeno. En la práctica, sin embargo, el SHE se utiliza raramente debido a que otros electrodos de referencia son mucho más fáciles de manejar. En estos casos, los datos correspondientes al electrodo de referencia siempre son ajustados. Algunos electrodos de referencia usados son los de mercurio/calomel saturado con KCl y el de plata/cloruro de plata (Bühler y Bucher, 1982).

II.2. Medición del potencial de óxido-reducción.

Existen dos maneras de medir el PRC: por medio de colorantes o de electrodos. Sin embargo, los colorantes pueden ser tóxicos para las células o pueden inhibir las actividades enzimáticas en fluidos biológicos (Hill, 1973).

Electrodos.

El potencial redox del cultivo puede ser medido con electrodos debido a que el potencial de un electrodo inmerso en un líquido es dependiente de la actividad de los electrones en el líquido. Las características con las que debe contar un electrodo son:

1. El material del cual está fabricado debe tener alta conductancia electrónica.
2. Neutralidad hacia el líquido que se va a analizar.
3. Velocidad suficiente de intercambio electrónico en la frontera de la solución y el electrodo del sistema redox (o en la mezcla de estos sistemas) que pueda garantizar valores estables del potencial del electrodo y reversibilidad en un sistema redox específico (Kjaergaard, 1977).

Otro concepto que es necesario manejar para conocer la respuesta de un electrodo es la "densidad de la corriente de intercambio", la cual tiene una gran influencia en la precisión, el tiempo de respuesta y reproducibilidad de la medición del potencial redox. Dicho concepto se basa en que en todos los procesos electroquímicos, los electrones migran del material del electrodo a la solución de la muestra o viceversa. Si se designan estas dos corrientes parciales como i_+ e i_- , en el estado de equilibrio, ambas tienen igual magnitud y su módulo es conocido como la densidad de la corriente de intercambio i_0 :

$$i_0 = i_+ = i_- \text{ [Amp/cm}^2\text{]}$$

Las densidades de las corrientes de intercambio son altamente dependientes del material del electrodo, del sistema redox y de la concentración de las especies redox en la solución de la muestra. Para densidades de corrientes de intercambio bajo condiciones estándar los valores se encuentran en el intervalo de 10-25 Amp/cm² (Bühler y Bucher, 1982).

La siguiente comparación ilustra la importancia de la densidad de corriente de intercambio:

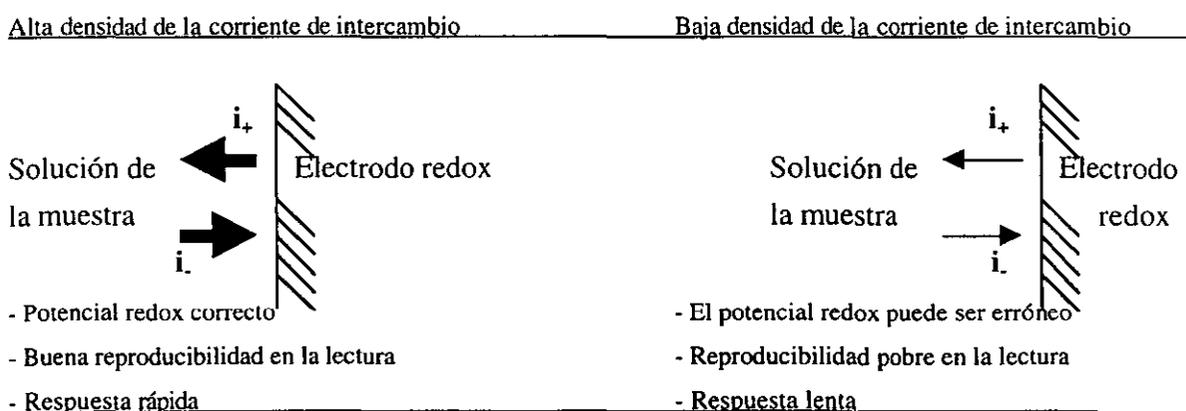


Figura II.1. Densidad de la corriente de intercambio.

Dados los requerimientos anteriores, actualmente los electrodos utilizados para medir el potencial redox están compuestos en su superficie metálica por anillos metálicos de platino, paladio, plata u oro para promover un mejor intercambio electrónico, siendo preferentemente utilizados los de

platino. La ventaja de utilizar este tipo de electrodos es que son relativamente baratos, fáciles de esterilizar y robustos (Dahod, 1982). Otros tipos de electrodos que también han sido usados para medir el redox son:

1. De rodio o iridio.
2. De capa fina, hechos con metales nobles para agrandar la superficie de los mismos.
3. De mercurio u otros metales.
4. De diversas variedades de carbón, preferentemente de grafito.
5. De semiconductores (óxido de estaño o de titanio).
4. De vidrio.

De estos 6 tipos, los primeros dos son especialmente útiles para medir redox. Electrodo del tipo 6 son ideales para lecturas de pH pero también pueden usarse para redox (Kjaergaard, 1977).

Muchos científicos han utilizado la medida del potencial redox en el medio de cultivo (PRC) para encontrar correlaciones entre éste y otros parámetros tanto extracelulares como intracelulares. Dichas correlaciones se discutirán posteriormente.

II.3. Eventos celulares dependientes del Potencial Redox

Dentro de la célula, la mayoría de las reacciones metabólicas son de tipo óxido-reducción y el balance entre ellas determinará el valor del potencial redox intracelular (PRI). Aún cuando no se conocen de manera exacta las interrelaciones que existen entre el PRC y el PRI, es obvio que ambos están relacionados, siendo uno efecto del otro y viceversa. Entre los eventos celulares involucrados en este proceso se encuentran la generación de especies reactivas de oxígeno, la reducción del ambiente por las células, el control del crecimiento y la muerte celular. Estos procesos pueden presentarse por influencia del medio ambiente, por lo que pueden brindar una explicación sobre los eventos afectados por el PRC.

II.3.1. Generación de especies reactivas de oxígeno.

El oxígeno *per se* es un componente tóxico, aunque las velocidades de inactivación enzimática por este compuesto en células aerobias son demasiado lentas y demasiado limitadas como para tomarse en cuenta. De hecho, los principales efectos tóxicos del oxígeno son atribuidos a la formación de radicales libres.

Un radical libre es cualquier especie que contiene uno o más electrones no apareados y es capaz de tener existencia independiente. Estos radicales pueden formarse fácilmente cuando un

enlace covalente se rompe y un electrón de cada par permanece en cada átomo, proceso conocido como fisión homolítica. La energía requerida para disociar el enlace covalente puede ser suministrada por calor, radiación electromagnética, o es el resultado de algunas reacciones enzimáticas. Las formas más reactivas de oxígeno conocidas como oxígeno simplete se generan por alguna entrada de energía. Si a la molécula de oxígeno se le agrega un solo electrón se forma el radical *superóxido* (O_2^-), con un solo electrón no apareado, el cual es menos reactivo que el O_2 , a pesar de su nombre. Al agregar un electrón más se formará el *ion peróxido* (O_2^{2-}), el cual no es un radical en sí debido a que no tiene electrones no apareados. En este compuesto, los enlaces son débiles y por tanto inestables, por lo que pueden agregarse 2 electrones más para formar $2O_2^{2-}$. Generalmente en sistemas biológicos el producto de la reducción de estos dos electrones es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Dado que en este compuesto el enlace de los oxígenos es débil, éste puede descomponerse fácilmente por fisión homolítica dando como origen los radicales hidroxilo (OH^\cdot). Dentro de los sistemas biológicos existen metales tales como Fe y Cu que ayudan a que esta reacción se lleve a cabo (Cadenas, 1989).

La producción de peróxido de hidrógeno, principalmente por la vía del O_2^- , se ha observado en mitocondria y microsomas, y la concentración de éste aumenta conforme aumenta la del oxígeno del alrededor. También existen varias enzimas que lo producen sin que el O_2^- sea el intermediario, siendo ejemplo de algunas de éstas la hidrógeno peroxidasa, D-aminoácido oxidasa y la urato oxidasa. El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante débil y puede inactivar directamente pocas enzimas, generalmente por la oxidación de los grupos de tioles esenciales (-SH). El peróxido de hidrógeno puede penetrar la membrana celular rápidamente mientras que el O_2^- no puede. Una vez dentro de la célula, puede reaccionar probablemente con el Fe(II) ó el Cu(I) para formar el radical hidroxilo, lo que probablemente sea causa de su toxicidad (Halliwell y Gutteridge, 1985; Basaga, 1990).

La generación de radicales hidroxilo puede también resultar de la exposición de los organismos a radiaciones iónicas tales como rayos-X o rayos-gamma, dado que el principal constituyente de éstos es el agua. Estos radicales son los responsables del daño al ADN celular y a las membranas. El oxígeno agrava el daño causado por la radiación iónica, debido a que permite la formación del radical superóxido a partir de los electrones del agua, produciendo más radicales hidroxilo. Otra forma de producción de radicales libres es la reacción de los iones metálicos con el peróxido de hidrógeno. La formación de radicales hidroxilo a partir del ozono también causa grandes efectos en los sistemas biológicos. De hecho, el ozono tiene la capacidad de “entrecruzar” los residuos de

tirosina en las proteínas oxidando los grupos -OH, existiendo también la evidencia de que este compuesto puede producir radicales de este tipo en solución acuosa.

Aún cuando anteriormente se consideraba que todos los efectos ocasionados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) eran negativos, recientemente se ha observado que el balance intracelular en la generación de estas especies es importante para procesos de diferenciación y señalización (Suda *et al.*, 1993; Wolfreys y Oliveira, 1997; Finkel, 1998). Además se ha observado que el estrés oxidativo está involucrado en la muerte celular programada (Hockenbery *et al.*, 1993; Buttke y Sandstorm, 1994; Jacobson, 1996) al igual que en la regulación genética, observándose que perturbaciones en el estado redox intracelular causan alteraciones en la diferenciación y el desarrollo. El descubrimiento de nuevos genes y rutas que son afectados por agentes oxidantes ha llevado a la hipótesis de que las especies reactivas de oxígeno sirven como mensajeros intracelulares en la regulación genética y en la transducción de señales (Nakamura *et al.*, 1997; Allen y Tresini, 2000).

II.3.2. Protección celular contra los radicales libres.

Siendo el peróxido de hidrógeno el principal agente tóxico (debido a que lleva a la formación de radicales libres), ésta debe controlar la cantidad de peróxido para evitar que se acumule. Existen dos tipos de enzimas que remueven el peróxido de hidrógeno dentro de la célula. Estas son las catalasas y las peroxidasas.

Las catalasas llevan a cabo la reacción:



Mientras que las peroxidasas:

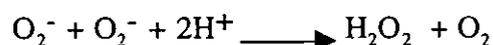


en donde XH_2 es el sustrato que se oxida.

La actividad de la catalasa está localizada en organelos subcelulares denominados peroxisomas. Dentro de las peroxidasas, la enzima glutatión-peroxidasa es la más encontrada en células animales y cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) a expensas de peróxido de hidrógeno.

También existen otras enzimas que ayudan a eliminar otro tipo de radicales. La metionin-sulfóxido reductasa protege a los residuos de metionina de la acción del oxígeno simple y de los radicales hidroxilo.

La superóxido dismutasa lleva a cabo la reacción:



Estas enzimas permiten el control de las especies oxidantes del medio y repercuten en el potencial redox intracelular.

Además, existen pequeños compuestos tales como el ácido ascórbico, el glutatión y el ácido úrico que sirven como protectores de la célula, inhibiendo la acción de los radicales libres.

El ácido ascórbico o vitamina C puede sintetizarse a partir de glucosa. Se requiere como cofactor para las enzimas prolin-hidroxilasa y lisin-hidroxilasa las cuales están involucradas en la biosíntesis del colágeno. Su principal papel es su capacidad para actuar como agente reductor (donador de electrones) y puede ayudar a desintoxicar varios radicales formados por ionizaciones. Este reacciona rápidamente con el O_2^- y con OH^- para dar semi-dihidroascorbato además de atrapar oxígeno simple.

El glutatión es el principal amortiguador del redox intracelular. Este compuesto es un trímero formado por glutamato, cisteína y glicina. Se considera que el intercambio de GSH en estado oxidado y reducido permite llevar a cabo la mayoría de las reacciones óxido-reductoras de la célula. Asimismo, su propio recambio es el que mantiene el PRI (Zmuda y Friedenson; 1983). Este participa como un agente atrapador de radicales hidroxilo y de oxígeno simple. Debido a que está presente en altas concentraciones puede ejercer efecto protector al daño ocasionado por el estrés oxidativo. También puede reactivar algunas enzimas que han sido inhibidas por altas concentraciones de oxígeno y es el cofactor de varias enzimas de diferentes rutas metabólicas tales como glioxilasa, maleilacetoacetato isomerasa y prostaglandin-endoperóxido isomerasa. Además, el GSH es un sustrato de intercambio para la glutatión peroxidasa y de la hidroascorbato reductasa.

El ácido úrico en concentraciones de 0.12-0.45 mM es un poderoso atrapador de oxígeno simple y de radicales hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1985; Basaga, 1990).

II.3.3. Reducción del ambiente por las células.

Otro de los eventos metabólicos que influye en el PRC y viceversa es la reducción del medio de cultivo ocasionada por las células. La reducción del ambiente, descrita como la habilidad de los cultivos para acumular compuestos reducidos tales como tioles, fue observada por primera vez por Wiles y Smith (1969). Ellos demostraron que el valor del PRC disminuye durante el crecimiento celular y aumenta en la fase estacionaria. Dicha información fue posteriormente reiterada por Ishii *et al.* (1981a y b) y Bannai y Tateishi (1986) quienes demostraron que los fibroblastos reducen una cantidad considerable de cistina a cisteína (Cys) en el medio. Esta reducción puede servir para

modular las actividades de las proteínas de la superficie celular y los eventos intracelulares (Lorenson y Jacobs; Robillard y Konings, 1982), además de funcionar como un mecanismo para mantener el estado del PRI y/o prevenir un exceso de Cys intracelular, la cual es tóxica para las células (Hwang y Sinskey, 1991). Además de la Cys, se encontró que en el medio de cultivo se acumulaban cantidades muy pequeñas de disulfuros mezclados de GSH y GSH/Cys.

Aún cuando no se conoce exactamente por qué los cultivos celulares reducen su ambiente, los tioles tales como la Cys, el 2-ME, el monotioglicerol, y el ácido ascórbico se utilizan frecuentemente para suplementar el medio de cultivo ya que se ha observado que el suministro de este tipo de compuestos incrementa la síntesis de GSH, así como la activación y la proliferación celular (Glacken *et al.*, 1989). También se ha demostrado que estos compuestos incrementan la formación de AcMo (Ohmori y Yamamoto, 1983 a,b). Este resultado puede deberse a que las características de crecimiento de la célula se mejoran en presencia de tioles. Hwang y Sinskey (1991) demostraron que aún cuando los tioles son oxidados rápidamente en presencia de oxígeno, su acumulación se presenta conforme la concentración de células viables incrementa debido a que el balance entre la velocidad de producción y de autooxidación se desplaza hacia la primera. Cuando las células alcanzan la fase estacionaria, la velocidad de producción de tioles disminuye y, debido a que continuamente se están autooxidando, su concentración también disminuye en el medio. Estos cambios se ven reflejados en los cambios del PRC. A una mayor concentración de tioles en el sistema menor será el PRC, siendo específico de cada línea celular y del medio de cultivo utilizado. Además, se ha determinado que el principal tiol acumulado es la cisteína. Asimismo, se ha observado que el mejoramiento en el crecimiento celular debido a la acción del suero es dependiente del redox ya que la actividad del suero se degrada con el tiempo y ésta se estabiliza con el suplemento de tioles (Glacken *et al.*, 1989). Choi y Jeh (1988) consideraron que una de las funciones del suero es el mantenimiento del potencial redox, comprobando que éste puede ser sustituido por agentes antioxidantes.

La reducción celular también puede funcionar como un mecanismo para mantener el estado redox intracelular y/o prevenir un exceso de Cys intracelular, la cual es tóxica para las células. La Cys es más reactiva y por tanto, más tóxica que el GSH. Esta variación en reactividad se debe a las diferencias en sus pK_a's. A pH fisiológico de 7.4, aproximadamente el 6% de la Cys está desionizada mientras que solamente el 1% de GSH se ioniza. Las formas ionizadas o el anión tiolato son las especies reactivas. Por tanto, la concentración intracelular de Cys se mantiene baja siendo del orden de 30-200 μ M, mientras que la concentración de GSH se puede mantener en niveles mucho más altos (aproximadamente 4-10 mM en hibridomas) (Hwang *et al.*, 1992).

II.3.4. Apoptosis.

La apoptosis es un proceso de muerte genéticamente controlado que puede ser desencadenado por varios estímulos (Bursch *et al.*, 1990; Rodríguez y Reyes-Esparza, 1995). Entre ellos se encuentran la presencia de ROS, algunas drogas, desbalances en ciclinas, insuficiencia de nutrimentos (Singh *et al.*, 1994; Mercille y Massie, 1994a), la falta de oxígeno (Mercille y Massie, 1994b, Malhotra y Brosius III; Otero *et al.*, 1999), etc. Todos estos factores provocan reacciones en cascada que conducen al suicidio celular (Vaux y Strasser, 1996).

Las características generales de las células en apoptosis son: 1) pérdida de contactos celulares y otras estructuras membranales especializadas (microvellos); 2) condensación de la cromatina y del citoplasma por la salida de líquido intracelular y desaparición de poros nucleares; 3) disociación del nucleólo, produciendo partículas que se asocian a la periferia de la cromatina condensada; 4) fragmentación del núcleo, rompimiento del ADN a nucleosomas y dilatación del retículo endoplásmico; 5) rompimiento de la célula en vesículas (cuerpos apoptóticos); 6) fagocitosis de los residuos celulares por macrófagos o por células adyacentes mediante enzimas lisosomales (Bursch *et al.*, 1990; Rodríguez y Reyes Esparza, 1995).

Se sabe que la muerte celular programada está regulada por diferentes genes, identificándose principalmente dos clases: aquellos que promueven la apoptosis y aquellos que la inhiben. Dentro de este último grupo es importante el papel de *bcl-2*, el cual se considera un gene antiapoptótico que protege a la célula de este proceso. El papel de la conexión entre Bcl-2 y la presencia de especies reactivas de oxígeno era controversial. Aún cuando había evidencias de que puede actuar sobre una ruta antioxidante (Hockenbery *et al.*, 1993; Cotter y Al-Rubeai, 1995; Singh *et al.*, 1996), regulando la acción de las ROS (Jacobson y Raff; Bandyopadhyay *et al.*; Shimizu *et al.*, 1995), otros reportes ponían en duda dicha relación, considerando que aún cuando esta proteína se encuentra muy cerca de los sitios generadores de ROS en la célula, Bcl-2 actúa de manera independiente (Kane *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1997). Reportes más recientes han demostrado la relación entre apoptosis y estrés oxidativo (Lipton *et al.*, 1993; Fernandez *et al.*, 1995; Vidal *et al.*, 1998; Fontaine y Averill; Hart *et al.*; Oikawa *et al.*, 1999). Por ejemplo, Edington (1993) ha reportado que las células de mamífero se encuentran en un estado de balance oxidativo en el cual la sobrevivencia requiere un apropiado balance de oxidantes y antioxidantes. Buttke *et al.* (1994) proponen que en algunas situaciones, la tendencia de una célula de ir hacia la proliferación o apoptosis dependerá de su habilidad de mantener dicho balance. Hampton y Orrenius (1998) han propuesto que el proceso de apoptosis está regulado por medio del estado redox de las células en el sistema inmune. Así también, Hansson *et al.* (1996) indujeron la apoptosis en cultivos de células de linfocitos (natural killers) por medio de las especies reactivas generadas por los monocitos en

cultivo. A nivel molecular, se ha propuesto que el tipo de muerte presente en un cultivo puede ser objeto de la activación de algunos mecanismos mitocondriales, controlados por el balance redox, que llevan a la célula a decidir si muere por necrosis o por apoptosis (Chernyak; Hirsch *et al.*; Marchetti *et al.*, 1997; Mignotte y Vayssiere, 1998; Oikawa, 1999). Madeo *et al.* (1999) demostraron que el estrés oxidativo es un regulador del proceso apoptótico considerando también que hay diversas vías de transducción de señales que pueden desencadenar este proceso de muerte. Otra evidencia es que la limitación del suero induce la apoptosis en las células, y que el suplemento de agentes antioxidantes como sustitutos del suero fetal bovino, permite mantener el PRC y por tanto el control sobre las ROS (Choi y Jeh, 1988) y prevenir la apoptosis. Asimismo, se ha demostrado que algunos antioxidantes, como son los tioles (tiocarbamatos, Cys, 2-ME) son inhibidores efectivos de la apoptosis (Ishii *et al.*, 1981a y b). Sin embargo, se cree también que Bcl-2 puede actuar en rutas independientes al redox. Asimismo, se ha observado que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en hibridomas prolonga la vida del cultivo y evita parcialmente que se presente la muerte celular programada permitiendo un incremento en la producción de anticuerpo monoclonal (Itoh *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1996; Fassnacht *et al.*; Simpson *et al.*; Terada *et al.*, 1999, Mastrangelo *et al.*, 2000a y b).

II.4. Diferentes aplicaciones de la manipulación del potencial redox en la biotecnología

Aún cuando el PRC es un parámetro fácilmente medible y puede brindar información importante con respecto al metabolismo celular y las condiciones del cultivo, su aplicación en procesos biotecnológicos ha sido relativamente escasa refiriéndose principalmente a su monitoreo. A continuación se presentan algunos ejemplos de esto en diferentes campos de la biotecnología con la finalidad de demostrar lo novedoso de este trabajo dentro del área de cultivo de células de eucariotes superiores donde la aplicación es todavía más limitada con respecto a las fermentaciones microbianas y biorremediación.

II.4.1. Plegamiento de proteínas.

La investigación en este campo tiene dos rubros: por un lado se está investigando el efecto del potencial redox en la estabilización y conformación de proteínas *in vitro*; es decir, una vez que se han obtenido las proteínas en forma de cuerpos de inclusión, se analiza de qué manera se puede incrementar el rendimiento del plegamiento de la proteína utilizando diferentes sistemas de amortiguación del potencial redox (Huth *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1998). Además, varios estudios van enfocados a utilizar proteínas óxidoreductoras como sistema de ayuda para incrementar los rendimientos de plegamiento. También, se está utilizando la coexpresión de proteínas auxiliares para poder optimizar el plegamiento de las proteínas problema, las cuales

posteriormente son separadas por el rompimiento de enlaces entre la proteína problema y la auxiliar. Por otro lado, existen muchos estudios en los que se presenta el efecto que tiene el redox intracelular en la conformación de las proteínas dentro del retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi (AG) y citoplasma (Biocca *et al.*, 1995). En este campo existen una variedad de estudios enfocados a enzimas óxidoreductoras como es el caso de la protein-disulfuro isomerasa (PDI) (Ryabova *et al.*; Walker y Gilbert, 1997), la piruvato carboxilasa (Irani *et al.*, 1999) o la disulfuro óxidoreductasa (Jacobi *et al.*, 1997). También se están descubriendo nuevas proteínas con funciones similares localizadas en el RE. Además, se ha estudiado el redox intracelular en cada uno de los organelos para dilucidar de manera más clara el proceso de plegamiento de proteínas *in vivo*. A continuación se citan algunos ejemplos característicos.

Considerando el plegamiento *in vitro*, la optimización de las condiciones redox es crítica para obtener una mayor producción de las proteínas. Tal es el caso del plegamiento de la hormona glicoproteica gonadotropina coriónica humana, producida por *E. coli*. Huth *et al.* (1994) demostraron que la formación de puentes disulfuro durante el plegamiento *in vitro* puede ser el paso limitante para obtener proteínas biológicamente activas y que las velocidades de plegamiento y ensamble que involucran la formación de puentes disulfuro pueden ser optimizadas por un sistema simple de amortiguación del redox compuesto por cisteamina y cistamina. Otra estrategia para llevar a cabo el plegamiento *in vitro* de proteínas involucra las correspondientes proteínas reducidas con la enzima protein-disulfuro óxidoreductasa. Estas reacciones son llevadas a cabo en la presencia de glutarredoxina y un amortiguador de redox con un potencial de -270 mV a -140 mV. Este método es utilizado para producir proteínas humanas terapéuticas en bacterias como *E. coli*. Las proteínas que pueden ser regeneradas por este método son (pro) insulina, somatomedina C, activador del plasminógeno, somatotropina, factor VIII-F, factores de coagulación de sangre, interleucinas, RNAsas pancreáticas de mamífero e inhibidores de tripsina, interferón, quimiosina y prolactina entre otras (Ljung *et al.*, 1996). Xu *et al.* (1996) han estudiado el papel que juega el potencial redox en la estabilidad de algunas enzimas recombinantes con diferentes especificidades. Otro ejemplo es el plegamiento de una peroxidasa recombinante producida en *E. coli* como cuerpo de inclusión. El proceso de naturalización de esta enzima consta de dos etapas: en la primera, los microcuerpos se solubilizan en presencia de un agente reductor, como lo es el ditioneitol (DTT); en la segunda etapa, la enzima se coloca en una solución con un agente reductor menor y se utiliza la protein-disulfuro isomerasa para incrementar la eficiencia del plegamiento (White *et al.*, 1995).

También, la ingeniería genética está jugando un papel primordial en el plegamiento de proteínas. La coexpresión de una proteína de unión específica en *E. coli* incrementa los rendimientos del plegamiento correcto de la somatomedina-C humana. En este caso se utilizó un amortiguador

redox de glutatión durante el crecimiento de la bacteria para permitir la formación y el rompimiento de los puentes disulfuro en el periplasma de la bacteria (Samuelsson *et al.*, 1996).

Por otra parte, se ha observado que la formación de puentes disulfuro dentro del RE depende de que éste se encuentre en un estado oxidante (Ziegler, 1985; Bardwell *et al.*, 1993; Wittrup, 1995). Dicho estado se mantiene a través de la liberación de tioles pequeños hacia fuera del RE, como son la Cys y el GSH, y la secreción de tales compuestos es inhibida cuando cesa la síntesis de proteínas y se estimula cuando proteínas ricas en puentes disulfuro son translocadas dentro del RE. Por tanto, esta secreción pudiera unir la formación de enlaces disulfuro en el RE con la señalización redox intra e intercelular (Carelli *et al.*, 1997; Zheng, *et al.*, 1998). También se están determinando cuáles son las proteínas participantes en los procesos de plegamiento en el RE. Un ejemplo de ello, es lo reportado por Pollard *et al.* (1998) quienes estudian la presencia de Ero-1p, una proteína nueva y esencial del RE. Ellos concluyen que dentro del ambiente oxidante existe una maquinaria redox necesaria para el plegamiento de las proteínas unida a la formación de puentes disulfuro siendo Ero-1p un componente esencial de esta maquinaria.

Otra enzima importante dentro del proceso de plegamiento de proteínas en el RE es la proteína-disulfuro isomerasa (PDI). Esta enzima cataliza la formación, el rompimiento y el rearrreglo de los puentes disulfuro durante el plegamiento de proteínas. A la fecha se está dilucidando su conformación y determinando los sitios activos responsables de llevar a cabo los procesos anteriormente mencionados. Así, se ha determinado que la PDI consiste en módulos activos e inactivos de tiorredoxina. Estos módulos pudieran haber sido adaptados durante la evolución para brindarle a la PDI su espectro completo de actividad enzimática (Kemink *et al.*, 1997). Además, se están realizando mutaciones en esta enzima para conocer de que manera influye el redox de la enzima en el plegamiento de las proteínas (Holst *et al.*; Walker y Gilbert, 1997).

Otro ejemplo, es el incremento en la producción de la óxidoreductasa para incrementar la desulfurización por *E. coli* (Reichmuth *et al.*, 2000), teniendo aplicación tanto en el plegamiento de proteínas como en biorremediación. El entendimiento de cómo las proteínas se pliegan *in vivo* puede dar una nueva manera de diagnosticar y tratar enfermedades humanas que ocurren debido a defectos de plegamiento así como ayudar a eficientar la producción de proteínas.

II.4.2. Biorremediación.

Dentro del área de biorremediación se han establecido relaciones del potencial redox con la presencia de compuestos tóxicos y su biodegradación (Kaake *et al.*, 1992). De manera general, en esta área se manejan potenciales redox para indicar estados aeróbicos (oxidantes), anaerobios

(reductores) y estados intermedios. Los esfuerzos están dirigidos a la eliminación de compuestos N-heterocíclicos (Liu *et al.*, 1994), de compuestos policlorados (Stuart *et al.*, 1999) y de metales pesados (Mege y Bourdillon, 1985; Tremblay *et al.*, 1998). A continuación se mencionan algunos ejemplos.

La eliminación del Dinoseb (2-sec-butil-4,6-dinitrofenol) el cual es un agente herbicida nitrofenólico contaminante de suelos es una de las principales áreas de estudio. Este herbicida es degradado solamente bajo condiciones anaerobias y la medición del redox se utiliza como indicador de este estado para la degradación de dicho compuesto. En este caso, el redox se mide en la interfase de una solución del suelo con agua. La disminución de este parámetro en el suelo es ocasionada por diversos pretratamientos tales como la adición de productos de desecho del procesamiento de papas para crear condiciones de anaerobiosis. Se ha observado que cuando el redox es menor a -200 mV, la degradación del Dinoseb a carbono y nitrógeno dejando compuestos amino-aromáticos que previenen su polimerización es alta. Asimismo, se observa que el reemplazo de grupos amino por OH juega un papel importante en la degradación del herbicida en productos no tóxicos. El monitoreo del potencial redox sirve para determinar de manera sencilla y sin equipo sofisticado cuando se ha establecido en el suelo una condición de anaerobiosis y la degradación de este tipo de compuestos se inicia (Kaake *et al.*, 1992 y 1995). Con ello se abre el campo para estudiar de manera análoga la remoción de compuestos similares como es el caso del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), el cual ha sido reportado por Roberts *et al.* (1996).

Otro ejemplo característico de la utilidad del monitoreo del redox es la eliminación de metales pesados del suelo. Tal es el caso del Cromo VI, el cual puede ser removido por *Saccharomyces cerevisiae*. Se ha observado que cuando el redox disminuye de +321 mV a +90 mV, se presenta un incremento en la concentración de bicarbonato y una reducción de Cromo (VI) de 1.9 mg/L a cero. De esta manera, el monitoreo del redox sirve para indicar el porcentaje de reducción de este metal (Krauter *et al.*, 1996). También se han utilizado otros microorganismos con la misma finalidad, como es el caso de *Pseudomonas fluorescens* LB300 y *Bacillus* sp. (Wang y Xiao, 1995).

II.4.3. Fermentaciones microbianas.

Dentro de las primeras aplicaciones del PRC en el área de fermentaciones con microorganismos, se reportó que el potencial redox puede utilizarse para determinar los requerimientos de transferencia de oxígeno en un cultivo cuando el nivel de OD sea prácticamente cero (Dahod, 1982). Esto es debido a que los electrodos de OD no tienen una alta precisión a valores por debajo del 5% de OD, mientras que, en estos casos, el electrodo del PRC puede tomar lectura de valores más reductores que aquel correspondiente a esta condición de OD. Como ejemplo de este caso, es el uso del PRC

para determinar los niveles críticos de oxígeno para la respiración celular en la producción de L-leucina (Akashi *et al.*, 1977).

Oktyabrsky y Smirnova (1989) y Oktabr'skii y Smirnova (1989) observaron dos cambios en el PRC en cultivos a pH constante y con alta aireación en fermentaciones por lote de *E. coli*, *B. subtilis* y *B. megaterium*, estableciendo una relación con las fases de crecimiento y el agotamiento de nutrientes del cultivo. Uno de estos cambios correspondía a una disminución gradual en el PRC que era inversamente proporcional al OD durante la fase de crecimiento. El otro cambio correspondía a diferentes procesos de transición como son el agotamiento de fuentes de carbono, energía o nitrógeno o bien a cambios metabólicos de una fuente a otra, siendo éstos relacionados con el pH intracelular y la generación de grupos tiólicos. Kwong y Rao (1991 y 1992) realizaron el monitoreo del PRC para determinar cambios en los estados metabólicos en fermentaciones de aminoácidos de acuerdo a cambios en el OD. Se observó que el PRC cayó a un valor mínimo característico conforme el estado metabólico cambió de la fase de crecimiento a la de producción. Esta señal fue utilizada para incrementar el suministro de oxígeno y por tanto, incrementar la producción. Berovic y Cimerman (1979 y 1982) y Berovic (1999) concluyen que para una producción efectiva de ácido cítrico, los valores del PRC son importantes así como su relación con respecto al tiempo ya que mediante el perfil de la curva del PRC se puede predecir el éxito del proceso, por lo que el redox ofrece una efectiva y rápida indicación del desarrollo de la fermentación. Graindorge *et al.* (1994) desarrollaron un sensor basados en el comportamiento del redox en cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* para medir la actividad metabólica de este tipo de cultivos. Este trabajo posteriormente se profundizó por Harvey y Crundwell (1997) quienes establecieron un diseño experimental para el desarrollo de este cultivo en lechos de bacterias con este organismo. Sassi *et al.* (1996) reportan la influencia de diferentes concentraciones de OD y PRC en cultivos de *C. glutamicum* para eficientar la producción de L-lisina.

También se ha estudiado la influencia del PRC en la fisiología microbiana, por ejemplo, Wimpenny y Necklen (1973) reportan que el PRC es un parámetro que puede marcar estados fisiológicos tales como anaerobiosis, niveles máximos de citocromos, niveles de enzimas del ciclo de Krebs y velocidades de crecimiento en cultivos de *E. coli* y *Klebsiella aerogenes*. Una investigación novedosa es la realizada por Bepalov *et al.* (1996), quienes observaron que *E. coli* es capaz de "sensar" el ambiente redox en el que se encuentra y migrar a un ambiente reductor óptimo para su desarrollo, denominando a este tipo de respuesta redox taxis. Esta respuesta se observó utilizando un gradiente de quinona reducida/oxidada en un portaobjetos microscópico. La respuesta redox táctica es ocasionada por moléculas que se utilizan dentro del sistema de transporte de electrones, como es el caso de la 1,4-benzoquinona. El modelo que ellos proponen es que esta

respuesta es ocasionada cuando un sensor en la membrana detecta el cambio en el estado redox o la fuerza motriz de protones y genera una señal que modula la fosforilación de la proteína CheA, la cual regula los motores flagelares que controlan el comportamiento microbiano. Este modelo es similar a la aerotaxis (respuesta de los microorganismos al cambio de la concentración de oxígeno). Tal investigación sugiere que la redoxaxis puede ayudar a adaptar a los organismos a su ambiente ecológico y que además, existe un redox óptimo para el desarrollo de los cultivos a nivel de producción. Asimismo, Gill *et al.* (1998) han estudiado la influencia de ambientes reductores en la expresión de proteínas, crecimiento y consumo de oxígeno en *E. coli*. Recientemente, se ha profundizado en el papel del PRC sobre los flujos de carbono y nitrógeno en *E. coli*, abriendo nuevas perspectivas para la ingeniería de vías metabólicas (Goel, *et al.*, 1999; Lloyd *et al.*, 1999; Riondet *et al.*, 2000).

II.4.4. Cultivo de células de eucariotes superiores.

El estudio del PRC en cultivo de eucariotes superiores inicia en los 60's, cuando Daniels *et al.* (1965) tratan de controlar tanto el pH como el PRC en un nuevo modelo de fermentador para la producción de células Earl's "L". Posteriormente, Daniels *et al.* (1970a y b) reportan que el PRC puede jugar un papel fundamental en el desarrollo de cultivos de células Earl's "L", suponiendo que el PRC inicial del medio juega un papel primordial en el crecimiento del cultivo. Durante las dos décadas siguientes, el PRC pierde interés en esta área, hasta que recientemente se observa que el monitoreo en línea de este parámetro puede servir para determinar la concentración de células viables en cultivo de hibridomas (Hwang y Sinskey, 1991; Eyer y Heinzle 1996). Esto es debido a que las células animales tienen la capacidad de reducir el medio de cultivo (por la producción de compuestos tóxicos) durante su crecimiento. Este punto se discutió en la sección II.3.2. (Reducción del ambiente por las células). La información sobre la reducción celular ha permitido establecer correlaciones entre la disminución del PRC y el crecimiento celular por lo que mediante medidas *in situ* del PRC se puede conocer la concentración de células viables que se tiene en el cultivo. Estas correlaciones fueron reportadas por Hwang y Sinskey, (1991), Eyer y Heinzle (1996) y en este trabajo (Ver resultados y discusión) para el caso de hibridomas. Por otra parte, De León (1999), reportó una correlación similar para el caso de células hematopoyéticas. La ecuación que relaciona estos parámetros está descrita por:

$$\ln(\text{Células Viables/ml}) = a \text{ PRC} + b$$

Las constantes reportadas son:

Autor	a	b
Hwang y Sinskey (1991)	-0.0384	12.86
Eyer y Heinzle (1996)	-0.0175	12.30
De León (1999)	-0.0119	12.46

Además, de manera indirecta, debido a que no se ha monitoreado el PRC pero se sabe que este puede ser modificado por la adición de tiores, se ha estudiado el efecto de PRC reductores sobre el cultivo de células (Ishii *et al.*, 1981a, Ohmori y Yamamoto 1983b). Esta manipulación se ha realizado adicionando agentes reductores al medio como se discutió previamente en la sección II.3.3

Una caracterización bastante precisa del comportamiento PRC en sistemas sin células ha sido reportada por Plushlell y Flickinger (1996). Ellos reportan diferentes métodos utilizados para calibrar los electrodos proponiendo la estandarización de los mismos. Asimismo, reportan correlaciones entre el PRC y el OD y pH, de acuerdo a la ecuación de Nernst. También, Lee *et al.* (1998), correlacionaron el comportamiento de los cultivos redox con las variables de estado como el pH y el oxígeno disuelto en cultivos de hibridomas, señalando la relación entre células viables y PRC.

Por otra parte, el monitoreo del PRC permite distinguir efectos metabólicos como son el agotamiento de glucosa o glutamina de eventualidades operacionales. Higareda *et al.* (1997) utilizan el PRC junto con la velocidad específica de consumo de oxígeno (OUR) para determinar si los cambios en línea de estos dos parámetros son producidos por alguna falla operacional o por eventos metabólicos. Si se presenta un cambio en la presión parcial de oxígeno y éste se ve reflejado en un aumento del OD y el PRC disminuye (no sigue el comportamiento de la ecuación de Nernst), se trata del agotamiento de algún sustrato. Si la presión parcial de oxígeno disminuye, el OD aumenta y al mismo tiempo el PRC aumenta, se trata de una eventualidad operacional. Con ello, de una manera rápida y sencilla se puede predecir el comportamiento del cultivo.

También, el monitoreo del PRC puede ayudar a determinar el tiempo de cosecha y marca las fases de crecimiento, de infección y de aparición de muerte en cultivos de células de insecto (Cacciuttolo *et al.*, 1996). Otra aplicación es como indicador de la fase del proceso y para determinar el tiempo de inicio de la alimentación en cultivos de hibridomas por lote alimentado (Romein *et al.*, 1994).

Zupke *et al.* (1995) proponen que el control de los procesos fisiológicos puede llevarse a cabo a través de la modulación del nivel de OD y del PRC del cultivo. Ellos observaron que el OD tiene un efecto significativo en el metabolismo del nitrógeno y en los flujos intracelulares ya que el NAD en el citosol y en la mitocondria estaba más reducido en bajas condiciones de OD. Recientemente, Bonarius *et al.* (2000), han reportado el papel que juega un ambiente reductor u oxidante en los flujos de las rutas metabólicas en cultivo de hibridomas. Masuda *et al.* (2000) reportan el uso de reguladores dependientes del redox para la producción de proteínas recombinantes en cultivos de células de mamífero.

II.4.5. Control del PRC.

El PRC puede ser controlado de diferentes maneras, aunque a la fecha son escasos los reportes al respecto. El control del potencial redox se ha empezado a estudiar dentro del área de biorremediación. Como ejemplo de ello se encuentra lo reportado por Stuart *et al.* (1996, 1999) quienes analizan los efectos de valores elevados del PRC en la velocidad de dechlorinación reductiva del pentaclorofenol en cultivos metanogénicos alimentados con acetato. Ellos utilizaron peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o ferrocianuro de potasio para aumentar y mantener los PRC aparentes en 50, 100, 150 y 250 mV por arriba del valor normal del cultivo (el cual es de -250 mV). Se observó que a valores por arriba de +150 mV, la dechlorinación reductiva todavía persistió, aún cuando se afectaba la actividad metanogénica de los organismos. La degradación reductiva de este compuesto sigue una cinética de primer orden y es afectada por la adición de hidrógeno. Asimismo, Doong y Wu (1992), han estudiado el efecto del control del PRC en la degradación de hidrocarburos clorinados mostrando que hay remociones hasta del 99% de ciertos compuestos cuando el PRC es mantenido a 263 mV. Sin embargo, en este caso, no se plantea un PRC de referencia. Un sistema novedoso para la purificación de agua contaminada y su uso inmediato para riego, utiliza el control del potencial redox para prolongar la durabilidad del aparato de purificación. En este método, el agua contaminada se alimenta a través de una capa difusora de alta porosidad, la cual difunde hacia el suelo a regar. El redox es medido *in situ* en la capa de difusión y mantenido a un valor previamente establecido mediante la adición de oxígeno al sistema para evitar valores reductores. Con ello, el agua suministrada tiene un valor del redox estándar que es óptimo para el sistema de riego (Onada, 1995).

Considerando que existe un PRC óptimo para el desarrollo de los cultivos se han reportado varios trabajos en donde éste se ha intentado controlar mediante diferentes métodos. Por ejemplo, en el cultivo de levaduras, Preez *et al.* (1988) reportan el control del PRC mediante agitación en fermentaciones por lote alimentado de *C. shehatae* y *P. stipitis*, limitadas por oxígeno para producir D-xilosa con concluyendo que el PRC fue muy difícil de controlar debido al crecimiento celular y a

los eventos metabólicos del sistema. Otro intento por controlar el PRC es utilizando un sistema electroquímico que permite controlar el pH mediante la adición de acarreadores de electrones tales como rojo neutro y quinhidrona. Al sistema se le dan pulsos eléctricos continuos para mantener el PRC. Sin embargo, el uso de estos acarreadores afecta el crecimiento de *E. coli* (Thompson y Gerson, 1985). Se ha logrado controlar el PRC en cultivos de *Candida parapsilosis* mediante agitación dado que se manipula ella TOD del sistema. Los resultados muestran un incremento en la producción cuando el PRC es mantenido a 100 mV en fermentadores de escala piloto de 3000 L; la productividad se incrementó casi 4 veces en dicho cultivo (Oh *et al.*, 1998). Sin embargo, debido a que las condiciones de agitación se cambiaron a lo largo del cultivo, realmente no se puede descartar que dicho efecto sea por la agitación, la cual pudiera estar provocando cambios metabólicos en la célula que resulten en un aumento en las productividades. Berovic (1999) controla el PRC en fermentaciones de ácido cítrico a nivel de planta piloto mediante regulación química utilizando para ello la adición de peróxido de hidrógeno al 0.1% (agente oxidante) y glucosa al 20% como reductor. El control físico se lleva a cabo mediante manipulación de la aireación y la agitación. Dicho autor concluye que el control del PRC incrementa la productividad y puede utilizarse como un criterio de escalamiento en fermentadores de 100 y 1000 L. Matsumoto *et al.* (1999), han demostrado que el crecimiento logarítmico de *Thiobacillus ferrooxidans* puede prolongarse usando una electrólisis potenciostática que convierte el Fe (III) a Fe (II).

En el área de células animales, Hwang y Sinskey (1991) han reportado el control del PRC en cultivo por lote alimentado de hibridomas, mediante la adición de medio de cultivo. Sin embargo, consideramos que los efectos que él observa no se pueden atribuir directamente al PRC, sino a la adición de nutrimentos.

II.5. Aplicaciones clínicas del potencial redox

Aún cuando las siguientes aplicaciones no están relacionadas directamente con procesos biotecnológicos, éstas brindan una idea de como el potencial de óxido-reducción puede influenciar el metabolismo celular.

Si bien no es posible monitorear el PRI por métodos directos como son los electrodos, se ha reportado que cambios significativos en éste debido a la generación de radicales libres que oxidan el interior de la célula pueden ocasionar enfermedades tales como Parkinson, cáncer, Alzheimer, etc. También se conoce que estos radicales están relacionados con el SIDA (Barr y Tomel, 1994).

Se ha observado que un desequilibrio en la concentración de GSH (generalmente una oxidación) puede generar enfermedades críticas asociadas con alteraciones en su metabolismo muscular. La

situación de estrés oxidativo puede desequilibrar la defensa del músculo en contra de radicales libres de oxígeno e influir en el transporte de aminoácidos contribuyendo a la pérdida en el balance entre la síntesis de proteínas y su degradación (Hammarqvist *et al.*, 1997).

El estrés oxidativo también está implicado en varios desórdenes neurodegenerativos y puede ser un mecanismo común para desarrollar diferentes tipos de muerte celular como son necrosis, apoptosis y excitotoxicidad (Galazka y Freidman, 1997). Bains y Shaw (1997) reportan que el GSH tiene diferentes papeles en el sistema nervioso como son: atrapador de radicales libres, modulador redox de la actividad receptora ionotrópica y posiblemente como neurotransmisor. Una carencia de GSH puede incrementar el estrés oxidativo y pudiera elevar los niveles de moléculas excitotóxicas causando muerte celular en las neuronas. Esto está relacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Lou Gehrig, de Alzheimer y de Parkinson. Asimismo, el papel que juegan los antioxidantes ha permitido relacionarlos con la protección para este tipo de enfermedades (Knepp *et al.*, 1996).

En el caso de la enfermedad de Parkinson, Jurma *et al.* (1997) han demostrado que la disminución de GSH debido a una mutación en la enzima glutamil-cisteína sintetasa (enzima limitante en la síntesis de GSH) está relacionada con un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y de calcio. Existe controversia sobre el papel que puede jugar el hierro de acuerdo a sus diferentes estados de reducción para desencadenar reacciones dentro de esta enfermedad (Galazka y Freidman, 1997).

III. Objetivos

III.1. Objetivo general

Controlar el potencial redox del cultivo a nivel de biorreactor en cultivos por lote de hibridomas y determinar su efecto sobre la viabilidad y densidad celular, la producción y estabilidad de anticuerpos monoclonales, la muerte celular y el aprovechamiento de nutrimentos, para poder establecer una estrategia de control que permita incrementar la productividad del sistema.

III.2. Objetivos específicos

- Caracterizar de manera cualitativa y cuantitativa la muerte celular que se presenta en diferentes líneas celulares de importancia biotecnológica, como lo son los hibridomas murinos y las células de insecto Sf-9, con la finalidad de evaluar que tipo de muerte se induce bajo la carencia de nutrimentos y bajo diferentes condiciones óxido-reductoras.
- Desarrollar un programa de control computarizado que permita el control del PRC mediante variaciones en la composición de los gases de entrada y/o la adición de agentes antioxidantes.
- Evaluar el efecto del control del PRC entre -150 y 100 mV en el cultivo de hibridomas a través de la manipulación en tensión de oxígeno disuelto.
- Evaluar el efecto la adición de algunos antioxidantes tales como el 2-mercaptoetanol, la cisteína, el suero fetal bovino y el glutatión sobre el cultivo de hibridomas para establecer una estrategia alternativa para el control del PRC.
- Proponer una estrategia de control computarizada que permita manipular el PRC para incrementar la productividad del sistema.

IV. Materiales y Métodos

IV.1. Línea celular

Para este estudio se utilizó el hibridoma murino denominado BCF2, el cual secreta un anticuerpo monoclonal neutralizante y específico para la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffman (Zamudio *et al.*, 1992; Higareda *et al.*, 1997). El AcMo obtenido inhibe la unión de la toxina con las membranas sinaptosomales del cerebro de ratón y muestra una clara actividad neutralizante *in vivo*.

Para el análisis de genes antiapoptóticos se utilizó un hibridoma murino (TB/C3), el cual producía un AcMo contra la inmunoglobulina G de humano. La línea control contenía el plásmido sin el fragmento de Bcl-2 (PEF), mientras que la línea denominada como Bcl-2 sí contenía tal inserto. El medio de cultivo utilizado fue DMEM con 5% de SFB. Estos cultivos se realizaron en frascos T y frascos agitados de 30 mL de volumen de trabajo.

Para la caracterización de la muerte celular fisiológica también se usó la línea celular de insecto Sf9 (ATCC1711) sin infectar. Dicha línea celular proviene del ovario de pupa del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. Las células utilizadas estaban adaptadas al medio *Trichoplusia ni*-Fred Hink (TNM-FH) suplementado con 10% de SFB.

IV.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para el mantenimiento y la propagación de hibridomas fue el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma D-5030) suplementado con 4 g/L de glucosa, 4 mM de glutamina, 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 13.2 mg/L de ácido oxalacético, 0.8 mg/L de insulina cristalina, 5.5 mg/L de piruvato de sodio, 1% de solución 100X de aminoácidos no-esenciales (Sigma M-7145), 15.9 mg/L de rojo de fenol como indicador de pH, solución antibiótica/antimicótica [100 000 U/L penicilina, 100 mg/L estreptomycin, 250 ug/L amfotericina B, Sigma A-9909] y 10% v/v de suero fetal bovino (SFB) (Gibco 16000-044). Antes de la adición del SFB, el medio de cultivo se esterilizó por filtración (membranas Millipore, 0.22 µm) y se conservó a 4°C por tiempos no mayores de un mes.

Las células de insecto Sf9 fueron cultivadas en medio TNM-FH. Este medio se preparó a partir de medio de Grace (Gibco 11300-043) suplementado con 3.33 g/L de hidrolizado de lactoalbúmina (Sigma L-9010) a pH 6. Una vez esterilizado por filtración (0.22 μm), se le adicionaron 16.7 mL/L de solución ultrafiltrada de extracto de levadura (Gibco 18200-048), 0.05% p/v de Pluronic F-68 y 10% v/v de SFB estériles.

IV.3. Mantenimiento de la línea celular

Se modificaron las metodologías para la congelación y descongelación de hibridomas que se utilizaban en el laboratorio con la finalidad de promover un menor tiempo para reactivar la línea así como altas viabilidades. Las metodologías actualmente empleadas se describen a continuación:

IV.3.1. Congelación de células.

1. Centrifugar las células a 800 x g máximo y concentrar hasta una densidad de 5-10 x 10⁶ células viables/mL.
2. Resuspender lentamente el botón de células formado con 50% de medio de cultivo DMEM suplementado con 40% de SFB evitando burbujear.
3. Etiquetar y colocar los viales estériles en hielo seco.
4. Agregar 900 μL de la suspensión celular.
5. Adicionar 100 μL de dimetil sulfóxido (DMSO) (10% del volumen total del vial) a cada vial e inmediatamente colocar en hielo seco.
6. Envolver el vial en un aislante.
7. Congelar a -70°C por 24 h.
8. Pasado ese tiempo, colocar rápidamente en nitrógeno líquido.

IV.3.2. Descongelación de células.

1. Colocar 30 mL de medio DMEM frío sin SFB pH 7.2-7.4 en un tubo de centrifuga de 50 mL.
2. Descongelar el vial procedente del nitrógeno líquido frotándolo con la mano.
3. Extraer rápidamente la suspensión celular del vial con una pipeta de 1 mL y resuspender en el medio frío.

4. Dispersar las células completamente con una pipeta de 25 mL.
5. Centrifugar a 800 x g por 5 min.
6. Eliminar el sobrenadante pipeteando por las paredes del tubo.
7. Resuspender el botón de células en 10 mL de medio DMEM con 20% de SFB.
8. Incubar a 37°C durante 24 h.
9. Pasado ese tiempo agregar medio DMEM con 10% de SFB y subcultivar.

IV.3.3. Inóculo.

Todos los inóculos para los cultivos experimentales partieron de células subcultivadas por lo menos tres veces después de la descongelación. A todos los inóculos se le siguió la cinética de crecimiento con la finalidad de utilizar células que estuvieran en la fase exponencial media de crecimiento. Dichas células fueron subcultivadas en frascos estáticos de 25, 75 y 225 cm² de área superficial y mantenidas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5%. Las células fueron subcultivadas una vez alcanzada una concentración celular de 0.8 x 10⁶ células viables/mL. Además, todos los experimentos se iniciaron a una viabilidad celular mayor del 90% y a una concentración inicial de 0.1 x 10⁶ células viables/mL para evitar variaciones por el tamaño del inóculo.

IV.4. Cultivos estáticos por lote con adición de antioxidantes

Con la finalidad de establecer varias alternativas para la manipulación del potencial redox del cultivo (PRC), se probó la acción de varios antioxidantes para modificar de manera más drástica el PRC hacia valores más reductores de aquellos obtenidos con la manipulación del OD y el pH. Estos cultivos se desarrollaron en frascos estáticos de 25 y 75 cm² de área superficial. La adición de antioxidantes se realizó al inicio del cultivo o diariamente a lo largo de toda la cinética. Los antioxidantes empleados fueron el 2-mercaptoetanol (50 a 400 µM), cisteína (50 µM a 2 mM), suero fetal bovino (0, 10 y 20%) [ya que se sabe que éste contiene compuestos de este tipo (Glacken *et al.*, 1989)] y glutatión (125 µM a 5 mM). Estas concentraciones se ajustaron al volumen del medio de cultivo. La concentración de tioles fue verificada por la técnica de Ellman, la cual se describe más adelante. El PRC obtenido por la adición del antioxidante fue registrado fuera de línea por medio de un electrodo esterilizable combinado de platino (Ingold).

IV.5. Cultivos en biorreactor

IV.5.1. Sistema de control y adquisición de datos para oxígeno disuelto, pH y potencial redox.

La composición porcentual de oxígeno, nitrógeno y bióxido de carbono en la corriente gaseosa de entrada así como el pH, el OD y el PRC fueron adquiridos, controlados y graficados usando un programa de control retroalimentado de tipo proporcional, escrito en Microsoft QuickBasic. Este programa es una modificación de aquel desarrollado por Aguilar-Aguila *et al.* (1993) para mantener el pH y el oxígeno disuelto en valores constantes y predeterminados. En este caso, el programa de control tiene la versatilidad de: 1) controlar el oxígeno disuelto y el pH y monitorear el potencial redox; 2) controlar el potencial redox y el pH y monitorear el oxígeno disuelto y; 3) controlar el potencial redox y el oxígeno disuelto y monitorear el pH. Además, contiene la subrutina para adaptar un sistema de adición de antioxidantes y poder mantener los parámetros anteriores en valores constantes. Este programa controla el pH mediante manipulación en la concentración del bióxido de carbono, mientras que el oxígeno disuelto se controla mediante la manipulación de la concentración de oxígeno en el flujo total de entrada. En ambos casos, el gas de compensación es nitrógeno. En el caso del potencial redox del cultivo, el control puede realizarse de 2 maneras, manipulando la concentración de oxígeno o la concentración de bióxido de carbono; el nitrógeno es el gas de compensación también en este caso.

IV.5.2. Cultivos con control de oxígeno disuelto y pH.

Se realizaron cultivos a 3%, 50% y 300% de oxígeno disuelto constante y pH 7.2, los cuales sirvieron como control para los cultivos a PRC constante. Todos los cultivos se iniciaron con una concentración celular de 0.1×10^6 células viables/mL con una viabilidad superior al 90%. El biorreactor utilizado (Virtis de 1L de volumen nominal) está equipado con una barra magnética suspendida en la que la velocidad de agitación se mantuvo a 150 rpm. La aireación fue superficial. La temperatura del cultivo fue de 37 °C, controlándose mediante un baño de agua. El volumen de trabajo fue de 700 mL. El flujo total de gases (oxígeno, bióxido de carbono y nitrógeno) se mantuvo constante en 600 mL/min. Los flujos individuales de O₂, N₂ y CO₂ se midieron y controlaron a través de controladores de flujo másico individuales (Brooks Inst. Co. Hatfield, PA) los que a su vez estaban controlados por una computadora LC Macintosh

conectada a una interfase D/A y A/D MacAdios 411 (GW Instruments, Cambridge., MA). El algoritmo de control de tipo proporcional (descrito anteriormente) permitió mantener la tensión de OD (TOD) y el pH en los valores deseados y establecer la acción de control mediante la variación en la composición de los gases de entrada al sistema. Las mediciones del OD, pH, PRC y flujo de gases se adquirieron en línea, mostrándose gráficamente en la pantalla y fueron archivadas en el disco duro de la computadora. La TOD se midió en línea mediante un electrodo polarográfico esterilizable (Ingold, Wilmington, MA). El pH se midió por medio de un electrodo de vidrio esterilizable (Ingold). El PRC se midió mediante un electrodo combinado de platino esterilizable (Ingold). El diagrama del sistema de control y adquisición se muestra en el apéndice A.

IV.5.3. Cultivos con control de pH y potencial redox del cultivo.

Se desarrollaron siete cultivos con potencial redox controlado a nivel de biorreactor de 1L. Los valores predeterminados fueron -133 mV, -90 mV, -7 mV, 37 mV, 50 mV y 90 mV. El control del PRC se llevó a cabo mediante la manipulación de la concentración de oxígeno en los gases de entrada. El pH se controló a 7.2 mediante la manipulación de la concentración de CO₂. Todas las condiciones de cultivo fueron iguales a las indicadas para cultivos a concentración constante de oxígeno disuelto. El control del PRC se llevó a cabo mediante el programa de control y adquisición de datos descrito anteriormente.

IV.5.4. Calibración del electrodo para el potencial redox de cultivo.

El electrodo de redox fue limpiado para cada cultivo como lo reportan Hwang y Sinskey (1991). Debido a la dependencia directa de los valores del PRC con respecto al electrodo utilizado se hicieron pruebas con diferentes electrodos en las que se observó que en todos los casos las pendientes halladas entre las variaciones de OD y PRC fueron las mismas aún cuando la ordenada al origen no lo era. Por ello, con la finalidad de estandarizar todas las lecturas, se estableció como punto de referencia un valor de cero mV cuando las condiciones del medio fueran 50% OD, pH 7.2 y 37°C antes de la inoculación. A partir de este valor, se tomaron las lecturas de la variación del PRC con respecto al valor inicial. Valores negativos corresponden a valores reductores y valores positivos a valores oxidantes, con base en la convención internacional para la medición del PRC.

IV.6. Métodos analíticos

IV.6.1. Cuantificación de la concentración, tamaño y viabilidad celular.

La concentración y el tamaño celular se midieron con un contador electrónico de partículas (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics) con un tubo de apertura de 100 μm y utilizando una solución isotónica Isotón II (Coulter, 7546719) para diluir las muestras. El volumen aspirado para cada muestra fue de 500 μL . La cuantificación del tamaño celular también se utilizó para determinar la muerte celular programada, tal y como se muestra en el artículo publicado por Meneses-Acosta *et al.* (2001).

La viabilidad celular se determinó mediante conteo en un hemacitómetro, usando un microscopio Fisher Micromaster 20X por medio de la técnica de exclusión de azul de tripano (20% en PBS de la solución Sigma T-8154). En ésta, las células muertas son teñidas de azul mientras que las vivas permanecen refringentes. Además, dicha viabilidad fue corroborada por tinción diferencial con naranja de acridina (AO)/bromuro de etidio (EB) que se utilizó para medir apoptosis y que se describe posteriormente.

IV.6.2. Cuantificación de anticuerpo monoclonal.

Las concentraciones de anticuerpo monoclonal fueron determinadas por la técnica de sandwich de ELISA con modificaciones, misma que se describe a continuación:

1. Colocar en cada pozo 100 μL de anticuerpo de conejo anti-ratón [Zymed Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L) 61-6500] a una concentración de 0.01 mg/mL en PBS y dejar incubando de 12 a 14 h a 4 $^{\circ}\text{C}$. La composición del amortiguador de fosfatos (PBS) es: 8.75 g NaCl/L, 2.25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{L}$, 0.2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$ y 0.2 g KCl/L, pH 7.2-7.3.
2. Lavar cada pozo 2 veces con 200 μL de PBS/Tween,20. La solución de lavado se prepara agregando 0.5 mL de Tween 20 en 1 L de PBS.
3. Colocar en cada pozo 125 μL de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma A-7638) a una concentración de 10 mg/mL en PBS y dejar incubando 2 h a temperatura ambiente (TA).
4. Repetir el paso 2.
5. Para las muestras problema, hacer una dilución 1/200 en PBS y colocar 100 μL en los pozos a partir de la columna 4. Poner 100 μL de PBS como blanco en la columna 1. En las

columnas 2 y 3 colocar 100 μL de soluciones estándar de 25 y 50 ng/mL en PBS, respectivamente. Dichas soluciones se preparan a partir de una solución base de anticuerpo de ratón anti-rata [Jackson Immunoresearch Labs., Affinipure mouse anti-rat IgG (H+L) 212-005-082] de 2.4 mg/mL. Dejar incubando 2 h a TA.

6. Enjuagar la placa como en el paso 2 pero haciendo 3 lavados en lugar de 2.
7. Colocar en cada pozo 100 μL de anticuerpo de borrego anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina [Jackson ImmunoResearch Labs., Alkaline phosphatase-conjugated affinipure sheep anti-mouse IgG (H+L) 515-055-003] a una concentración de 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y dejar incubando 2 h a TA.
8. Repetir el paso 6.
9. Colocar en cada pozo 100 μL de PNPP (Paranitrofenol fosfato, Sigma 104-0) en solución de dietanolamina (DEA, Sigma 2286) a una concentración de 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a los 20 min agregar 100 μL de NaOH 2N para detener la reacción. La composición de la solución de DEA es 10 mL de DEA/L, 0.2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, 0.29 g NaN_3/L , a pH 9.8 ajustado con HCl.
10. Leer absorbancia a 405 nm y determinar la concentración de AcMo considerando la dilución realizada.

Los platos de ELISA (96 pozos, Nunc-Immunoplate) fueron leídos en un lector ELx-800 UV (Bio Tek Instruments, Inc.) y las concentraciones de AcMo reportadas fueron obtenidas del promedio de 8 pozos.

IV.6.3. Determinación de la estabilidad del anticuerpo monoclonal.

Para determinar si las condiciones de oxido-reducción a las que se sometieron los cultivos de hibridomas afectaban la estabilidad de los AcMo's producidos, éstos se midieron por la técnica de Western Blot utilizando geles de acrilamida no desnaturalizantes y no reductores. La metodología empleada se detalla a continuación:

Geles de poliacrilamida.

1. Preparar el gel de acrilamida al 8%. (Para un volumen de 3.5 mL: 1.8 mL de H_2O , 930 μL de acrilamida 30 %, 700 μL Tris 2M pH 8.0, 10.5 μL de PSA 10%, 3.5 μL TEMED).
2. Vaciar la acrilamida y dejar que polimerice por 20 min.

3. Agregar la solución concentradora al 4% de acrilamida. (Para un volumen de 1.5 mL: 1.21 mL de H₂O, 200 µL de acrilamida 30 %, 69 µL Tris 2M pH 6.8, 15.04 µL de PSA 10%, 1 µL TEMED).
4. Vaciar la acrilamida, colocar el peine y polimerizar por 20 min.
5. Sacar el peine, limpiar los pozos y colocar 30 µL de la muestra preparada [20 µL de muestra, 10 µL de H₂O y 10 µL de Magic-Mix (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.4% azul de bromofenol y 40% glicerol)]. El marcador de peso molecular (Sigma, M-4038) se preparó utilizando 10 µL de marcador , 18 µL de H₂O y 8 µL de Magic-Mix.
6. Las muestras se corrieron a 100 mV durante la etapa de concentración y a 200 mV durante la etapa de separación utilizando amortiguador de Tris- Glicina sin SDS como amortiguador de corrida.

Western Blot.

1. Una vez obtenido el gel marcar una esquina para verificar el lado; lavar ligeramente con agua y ponerlo en amortiguador II. Colocar la membrana de nitrocelulosa (Millipore, HAHY304F0) en amortiguador III. Agitar por 15 min.
2. Formar un “sandwich” colocando 4 papeles filtro impregnados de amortiguador III, la membrana de nitrocelulosa impregnada de amortiguador III, el gel del amortiguador II, 4 papeles filtro impregnados de amortiguador II y 2 papeles filtro impregnados de amortiguador I.
- *Formulación de los amortiguadores:* Amortiguador I: 36.3g/L Tris, 200 mL/L metanol. Amortiguador II: 3 g/L Tris, 200 mL/L metanol. Amortiguador III: 3 g/L Tris, 200 mL/L metanol, 3 g/L glicina.
3. Transferir las proteínas a la membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 400 mV a corriente constante a través del sistema semi-seco (Owl Scientific, HEP-1).
4. Revelar con tinción de Ponceau para observar la transferencia.
5. Enjuagar y bloquear la membrana con 100 mL de leche descremada (Carnation) en PBS por 30 min.
6. Lavar con solución de leche descremada al 0.1% en PBS por 2 min.

7. Hacer una dilución 1/2000 del anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa [KPL, affinity purified antibody peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (H+L) human serum absorbed, 074-1806] en 30 mL de solución 0.1% de leche descremada en PBS.
8. Incubar durante 1 a 1.5 h a TA.
9. Lavar 2 veces con PBS/leche y una tercera vez con PBS.
10. Revelar utilizando los reactivos quimioluminiscentes ECL (Amersham RPN 2106) y una película Kodak X-OMAT.

IV.6.4. Cuantificación de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y osmolaridad del medio de cultivo.

La glucosa, lactato, glutamina y glutamato se determinaron enzimáticamente en un analizador YSI modelo 2700 (Yellow Spring Instruments, Co.). La determinación se realizó a través de enzimas inmovilizadas en las membranas del equipo (glucosa oxidasa, L-lactato oxidasa, glutaminasa y L-glutamato oxidasa), las cuales catalizan la reacción entre la muestra y el oxígeno para formar el correspondiente derivado y peróxido de hidrógeno. El equipo contiene un sistema de electrodos amperométricos que responden a la presencia de peróxido. El flujo de corriente a través del ánodo es proporcional a la concentración del compuesto analizado, dada la relación estequiométrica de la reacción.

La osmolaridad del medio de cultivo se determinó con 50 μ L del medio en un osmómetro marca Precision Systems microsmometer.

IV.6.5. Cuantificación de amonio.

El amonio se cuantificó utilizando el método del indofenol propuesto por Kaplan (1965), el cual fue modificado para intensificar la sensibilidad del método a concentraciones menores de 6 mM. Se debe tener precaución de no inhalar los compuestos volátiles generados (cloraminas) dado que algunos son carcinogénicos. La técnica es descrita a continuación:

1. Tomar 25 μ L de muestra con ácido (5 μ L de HCl 1M/mL de muestra) y agregar 1 mL de solución A (10.615 g/L de fenol y 50 mg/L de nitroferrocianuro de sodio en agua MQ).

2. Adicionar 1 mL de solución B (5.1 g/L de hidróxido de sodio y 5.5 mL/L de hipoclorito de sodio en agua MQ) y contar el tiempo con cronómetro dejando pasar 30 segundos por muestra.
3. Dejar que transcurra la reacción durante 30 min.
4. Medir la absorbancia a 635 nm después de transcurrido el tiempo. Utilizar una curva de calibración con soluciones desde 0.5 a 10 mM de NH_4Cl desecado.

IV.6.6. Cuantificación de tioles.

La concentración de grupos sulfhidrilos totales se determinó mediante un método colorimétrico utilizando el reactivo Ellman [Acido 5,5´ditiol-bis (2-nitrobenzoico)] (Ellman, 1959). La metodología se describe a continuación:

1. Mezclar 0.6 mL de muestra con ácido, 0.6 mL de PBS y 1.2 mL de amortiguador de fosfato-EDTA pH 8.0. Amortiguador 0.2 M fosfato de potasio-10mM EDTA pH 8: 27.218 g/L fosfato de potasio, 100 mL/L EDTA 100 mM [37.254 g/L de EDTA (sal disódica) $\text{Na}_2\text{COH}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$], ajustar pH a 8 con sosa concentrada.
2. Leer la absorbancia a 412 nm.
3. Agregar 0.1 mL de solución 10 mM de DNTB y dejar transcurrir la reacción por 5 min. DNTB 10 mM: 3.963 g/L en solución 0.2 M fosfato de potasio 10 mM EDTA pH 8.
4. Medir el incremento de absorbancia a 412 nm después de este tiempo.
5. Hacer la curva estándar con cisteína desde 0.5 μM hasta 50 μM .
6. La concentración final de sulfhidrilos se calculó restando a la absorbancia obtenida a los 5 min el valor de las absorbancias a tiempo cero y del blanco (PBS) a los 5 min. Posteriormente, los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron con la curva estándar de cisteína. Las concentraciones obtenidas finalmente se multiplicaron por la dilución correspondiente.

IV.6.7. Determinación de la muerte celular programada.

IV.6.7.1. Electroforesis en gel de agarosa.

Dentro de los eventos bioquímicos involucrados en la apoptosis, existen dos principales actividades enzimáticas: proteasas y nucleasas. La actividad de la nucleasa es revelada por el análisis del ADN genómico. En células apoptóticas, el ADN se encuentra generalmente

fragmentado en múltiplos de 180 pb, correspondiendo al tamaño de los nucleosomas. Este fenómeno es causado por la actividad de una endonucleasa que corta específicamente los fragmentos de ADN que se encuentran entre las unidades nucleosomales. La característica observada es un patrón de escalera específico en el ADN genómico, difiriendo del patrón de necrosis, donde se encuentra un barrido indicando la degradación inespecífica del ADN. La técnica de extracción del ADN se muestra a continuación:

1. Colectar las células y lisar igual número de células de cada muestra.
2. Para 1×10^6 células lisar con 50 μ L de amortiguador lisis (EDTA 10mM, Tris-HCl pH 8, 50 mM Sarcosil 0.5%). Al momento de usar agregar proteinasa K, 0.5 mg/mL.
3. Incubar 1 h a 50 °C en agitación suave.
4. Agregar 25 μ L de RNAsa 0.45 mg/mL.
5. Incubar 1 h a 50 °C en agitación suave.
6. Centrifugar 20 min a 13000 x g (para enriquecer la fracción fragmentada de ADN).
7. Pasar aprox. la mitad del sobrenadante a un tubo nuevo (cuidar que no se venga el botón entero dado lo viscoso de la muestra).
8. Agregar medio volumen de EDTA 10 mM con 1 % de agarosa de bajo punto de fusión.
9. Calentar a 70°C antes de cargar el gel al 1.8 % de agarosa en amortiguador de 2 mM EDTA, 40 mM Tris, 35 mM Acetato de sodio (TAE) [4.84 g/L tris base, 2.72 g/L acetato de sodio, 0.74 g/L EDTA, pH 8.11].
10. Cargar el gel, colocando 20 μ L de muestra con 10 μ L de 0.4% de azul de bromofenol.
11. Correr el gel a 40 V por 15 h, utilizando amortiguador (TAE 0.5X)
12. Teñir el gel con 0.5 μ g/L de bromuro de etidio.
13. Ver en el transiluminador de U.V.

IV.6.7.2. Microscopía electrónica

Esta metodología fue proporcionada por el Dr. Horacio Merchant Larios del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, quien amablemente realizó la microscopía electrónica de hibridomas y de células de insecto Sf9. En el artículo publicado por Meneses-Acosta *et al.* (2001) se describen las características de la metodología después del proceso de fijación.

Técnica de fijación:

1. Centrifugar 1×10^6 células/mL a 800g máximo por 5 min.

2. Desechar el medio de cultivo cuidando que el botón de células no se disuelva.
3. Agregar 1 mL de fijador de Karnousky (el fijador debe cubrir totalmente la capa celular).
4. Dejar 1 h a temperatura de hielo o en el refrigerador.
5. Decantar el fijador y agregar el mismo volumen del amortiguador de cacodilatos evitando resuspender el botón.
6. Refrigerar hasta análisis posterior.

IV.6.7.3. Tinción con colorantes fluorescentes.

Esta técnica se basa en el principio de que el naranja de acridina (AO) y el bromuro de etidio (EB) son colorantes que se intercalan en el ADN y fluorescen bajo la luz UV. El naranja de acridina entra a todas las células no importando la integridad de su membrana. El bromuro de etidio sólo puede introducirse en células cuya membrana ha sido dañada. Usando un filtro verde-azul y luz UV, el AO tiñe las células de verde y el EB las tiñe de naranja. El EB es un colorante más fuerte que el AO y lo cubre cuando ambos se encuentran en la célula, por lo que las células que han perdido la integridad de su membrana se tiñen de naranja. En el artículo "*Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures*", (Meneses-Acosta *et al.*, 2001) se describen las características de los microscopios utilizados así como las referencias para dicha técnica. La metodología de tinción se describe a continuación:

1. Agregar a 50 μ L de suspensión celular 50 μ L de la mezcla de colorantes [100 μ g/mL de AO (Sigma A-6014) y 100 μ g/mL de EB (Sigma E-8741) en PBS] y mezclar bien. Se pueden probar relaciones más pequeñas a la suspensión pero acarrea problemas de pérdida rápida de fluorescencia en UV. El colorante es absorbido instantáneamente.
2. Contar las células usando un hemacitómetro a una ampliación de 20X, bajo un microscopio de epifluorescencia con luz UV. Las morfologías identificadas pueden ser de 4 tipos:
 - a) Células viables: las células teñidas de verde brillante con núcleo no fragmentado. Generalmente el núcleo es muy grande y toda la célula parece estar teñida de verde.
 - b) Células apoptóticas tempranas: las células son teñidas de verde con manchas verde brillante o fragmentos, los cuales corresponden a la cromatina condensada. La condensación de la cromatina indica que la célula ya está entrando en apoptosis pero todavía no pierde la integridad de su membrana.

c) Células apoptóticas tardías: las células se tiñen de verde con varias manchas naranja brillante o fragmentos, los cuales corresponden a la cromatina condensada. El color naranja y la presencia de la cromatina dispersa en el citoplasma indica que las células apoptóticas han perdido la integridad de la membrana y que están en una fase muy tardía de apoptosis.

d) Células necróticas: las células se tiñen de naranja (indicando pérdida de la integridad de la membrana) con estructura de la cromatina intacta; generalmente la célula total se tiñe de naranja.

Precauciones:

- AO y EB son altamente mutagénicos y por tanto deben tomarse precauciones al manejarlos.
- Si las células han estado muertas por un largo periodo de tiempo, pueden empezar a perder su cromatina. Consideramos a estas células como apoptóticas, ya que la cuenta se ha desarrollado del mismo cultivo (hacia el final del mismo) y ha indicado que el incremento de células libres de cromatina es proporcional a la disminución de células apoptóticas tardías. Sin embargo, se recomienda que esto debe verificarse para cada tipo de célula que se use.
- Se recomienda que las células no se expongan al colorante mucho tiempo antes de realizar el conteo y que por lo menos 200 células sean contadas para dar una cuenta con significancia estadística.

IV.6.7.4. Citometría de flujo.

La técnica de citometría de flujo se utilizó para analizar el ciclo celular de los hibridomas murinos y de las células de insecto Sf9. Dicha técnica se basa en la cuantificación del ADN relativo en los núcleos extraídos. El procedimiento de análisis se describe a continuación:

1. Ajustar las células (núcleos) a una concentración de 1×10^6 células/mL.
2. Formar un botón mediante centrifugación a $1200 \times g$ por 5 min.
3. Agregar 1 mL de la solución A e incubar por 10 min a temperatura ambiente, agitando en vórtex cada 2 min.
4. Agregar 1 mL de solución B e incubar por 10 min a temperatura ambiente, agitando en vórtex cada 2 min.
5. Agregar 1 mL de solución C e incubar por 10 min en baño de hielo, agitando en vórtex cada 2 min.

6. Centrifugar a 1200 X g por 5 min.
7. Aspirar 2 mL de la solución para concentrar la muestra.
8. Resuspender el botón, agitando ligeramente el tubo. En este momento las muestras están listas para ser leídas en el citómetro de flujo.

La excitación del yoduro de propidio se realiza a 488 nm y su emisión se colecta a 675 nm (FL4) en escala lineal.

La formulación de las soluciones fue:

- a) Solución base: 1 g/L ácido cítrico (Na_3) (Sigma S-2876), 1 mL/L Igepal CA-630 (Sigma I-3021), 522 mg/L tetrahidrocloreuro de espermina (Sigma, S-2876), 60.5 mg/L trizma hidrocloreuro (Sigma T-6666).
- b) Solución A: 30 mg/L de tripsina porcina (Sigma T-0134) a pH 7.6 en solución base.
- c) Solución B: 30 mg/L de inhibidor de tripsina (Sigma, T-1143) y 100 mg/L de ribonucleasa-A (Sigma, R-5500) a pH 7.6 en solución base.
- d) Solución C: 500 mg/L de yoduro de propidio (Sigma P-4170) y 1.16 g/L de tetrahidrocloreuro de espermina a pH 7.6 en solución base.

Todas las soluciones fueron preservadas a -20°C .

IV.7. Consideraciones matemáticas.

IV.7.1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de producción de AcMo y velocidades específicas de consumo de nutrimentos.

Todos los cálculos se realizaron utilizando la velocidad específica de crecimiento aparente (μ). Dicha velocidad es el resultado de restarle a la tasa de crecimiento real la tasa de muerte. La μ fue determinada en la fase de crecimiento exponencial, donde:

$$dx/dt = \mu x$$

Integrando:

$$\text{Ln}(X/X_0) = \mu t$$

donde X y X_0 son la concentración de células viables al tiempo t y al inicio del cultivo, respectivamente. La μ se calculó a través de la regresión lineal obtenida de la gráfica de $\ln(X/X_0)$ contra tiempo.

Los coeficientes metabólicos de glucosa, lactato, glutamina, glutamato, amonio y tioles se determinaron mediante la ecuación:

$$q_i = \mu m$$

donde m es el rendimiento con respecto a células y se calculó como la pendiente de la regresión lineal entre el nutriente o metabolito “i” y la concentración de células viables.

La velocidad específica de producción de AcMo fue determinada mediante la pendiente de la regresión lineal generada de la gráfica de concentración de AcMo y el índice de viabilidad. El índice de viabilidad ($\int X dt$) se determinó como el área bajo la curva de concentración de células viables contra tiempo, usando el método integral de los trapecios, de acuerdo a lo reportado anteriormente por Luan *et al.* (1987) y Ramírez y Mutharasan (1990).

IV.7.2. Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno.

La velocidad de consumo de oxígeno se calculó haciendo un balance de oxígeno alrededor de la fase líquida del biorreactor. La ecuación de balance es:

$$dC_L/dt = k_L a (C^* - C_L) - VCO$$

donde C_L y C^* son la concentración de oxígeno en el medio y a la saturación, respectivamente. VCO es la velocidad de consumo de oxígeno, $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y t es el tiempo. El valor de C_L se obtiene de la medición del electrodo de oxígeno disuelto sumergido en el cultivo. La determinación de VCO en línea se realizó de acuerdo con lo anteriormente reportado por Higareda *et al.* (1997).

El $k_L a$ se determinó mediante el método de Tiempo de Respuesta utilizando nitrógeno como gas para desorber el oxígeno, y el valor obtenido fue de 1.03 h^{-1} .

V. Resultados y Discusión

El trabajo realizado se dividió en dos partes para una mejor comprensión. Por un lado, se reporta una sección de caracterización de las líneas celulares empleadas y , por otro, lo referente al control del PRC y sus repercusiones en el cultivo de hibridomas murinos.

La caracterización de las líneas celulares tuvo como finalidad establecer las características de la línea celular modelo utilizada para observar los efectos de la manipulación del PRC sobre ésta. El conocimiento de tales características y la optimización del medio de cultivo permitió conocer el comportamiento de tales células e identificar si es que se presentaba algún efecto por parte del PRC. Primeramente, se incrementó la capacidad amortiguadora del medio de cultivo con la finalidad de evitar una acidificación temprana y permitir un mejor control del pH por mayor periodo de tiempo. Esto también permitió que el efecto de las variaciones de pH sobre el PRC se minimizara. También, se caracterizó de manera muy detallada la muerte celular (y de hecho, el objetivo se amplió al establecer las características de este tipo de muerte en células de insecto Sf9), tanto cualitativa como cuantitativamente, con la finalidad de establecer claramente si había algún efecto del PRC sobre las células modelo o inducía la muerte celular programada o apoptosis debido a que existe información controversial acerca del desencadenamiento de la muerte apoptótica por estrés oxidativo. Al realizar este análisis, se encontraron características poco comunes en las células de insecto Sf9, y dado lo novedoso de las observaciones, fue posible escribir un artículo que se muestra prosteriormente en la sección V.1.2. Al hacer la microscopía electrónica, se determinó que los hibridomas modelo contenían un retrovirus endógeno, por lo que se reportan tales datos con la finalidad de hacer incapié en el cuidado que debe tenerse al manejar hibridomas para la producción de AcMo's.

Además, se exploró el área de biología molecular para evitar la apoptosis. La finalidad de ello fue conocer las características de las líneas transfectadas con un gene antiapoptótico denominado *bcl-2*. el cual se cree que está relacionado con las vías antioxidantes intracelulares. Con ello pueden establecerse a futuro nuevas estrategias que permitan evitar la apoptosis por medio de la manipulación genética así como por el control de parámetros tales como el PRC.

Una vez establecidas las características de las líneas a trabajar se abarcó el segundo rubro que es el control del PRC. Inicialmente se desarrolló el programa de control del PRC, el cual permitió mantener el PRC en valores predeterminados mediante la manipulación del OD. Asimismo, se realizaron cultivos a diferentes condiciones de OD para observar el comportamiento del PRC y correlacionarlo con el número de células viables. Además, se desarrollaron cultivos a diferentes

PRC, tanto oxidantes como reductores. En todos los casos se valoraron los parámetros cinéticos y la muerte celular. Paralelamente, se valoró la acción de ciertos antioxidantes sobre el cultivo de hibridomas. Todo ello con la finalidad de proponer una estrategia de control que permita incrementar las productividades del sistema.

V.1. Caracterización de líneas celulares

V.1.1. Cinéticas con glucosa y fructosa en hibridomas murinos BCF2.

Con la finalidad de eliminar la temprana y alta acidificación del medio después de 72 h de cultivo a flujo constante de 6% CO₂ en las incubadoras y en el bioreactor, se modificó la concentración de bicarbonato de sodio de 2.2 g/L (control) a 3.7 g/L. Además, se probaron diferentes combinaciones de fructosa con glucosa para determinar si la primera podía ser usada como sustituto de la fuente de carbono principal con el objeto de disminuir la producción de ácido láctico en los hibridomas ya que éste es el principal compuesto que causa la acidificación del medio de cultivo ocasionando muerte celular de forma prematura. Otro efecto negativo, es que dicha acidificación puede interferir en el control del PRC por lo que era necesario incrementar la capacidad amortiguadora del medio de cultivo. Los resultados se muestran en la Figura V.1. Como se observa (Figura V.1a), las concentraciones más altas de células totales se encontraron en los cultivos que contenían glucosa, mientras que en aquel formulado solamente con fructosa se alcanzó un crecimiento máximo del 60% en comparación al cultivo control. En la Figura V.1b se muestra que la concentración de células viables disminuyó después de 72 h, en el cultivo control y en aquellos en los que se utilizaron combinaciones de glucosa y fructosa, independientemente de la densidad celular alcanzada. Sin embargo, en el cultivo con 4 g/L de glucosa y 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, las células continuaron en fase exponencial después de 120 h aún cuando la viabilidad empezó a disminuir (Figura V.1c). En el cultivo con fructosa, la concentración celular viable disminuyó después de 96 h pero la velocidad específica de crecimiento ($\mu=0.029$ 1/h) fue el 75% de aquella alcanzada en los cultivos con glucosa. En el caso de la viabilidad celular (Figura V.1c), ésta fue menor al final del cultivo conforme aumentó la concentración de fructosa inicial en el medio, obteniéndose mayor viabilidad en el cultivo control y en el cultivo con 3.7 g/L de bicarbonato y 4 g/L de glucosa.

Por otra parte, para determinar si el problema sobre el crecimiento celular era debido a un cambio de osmolaridad, se realizó la medición de ésta y los resultados se presentan en la Tabla V.1.

Como se observa, la osmolaridad no sufre un cambio drástico. De acuerdo con las especificaciones de la formulación del medio de cultivo, un cambio de 50 mOs no debe tener efecto sobre el crecimiento celular (Catálogo Sigma-Aldrich). Esto se corroboró con los datos obtenidos para el

cultivo con 1 g/L de glucosa, el cual presentó la mayor diferencia en osmolaridad pero no en crecimiento celular con respecto al cultivo control. Los datos también indican que el aumento en el bicarbonato de sodio no representa un gran cambio en la osmolaridad del sistema por lo que el uso de una mayor concentración de éste puede permitir una mayor capacidad de amortiguamiento con respecto al pH.

Tabla V.1. Osmolaridad de diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Osmolaridad (mOs)
4 g/L glucosa + 2.2 g/L bicarbonato de sodio (Control)	337
4 g/L glucosa + 3.7 g/L bicarbonato de sodio	339
4 g/L fructosa + 3.7 g/L bicarbonato de sodio	342
2 g/L glucosa + 2 g/L fructosa + 3.7 g/L bicarbonato de sodio	357
1 g/L glucosa + 3 g/L fructosa + 3.7 g/L bicarbonato de sodio	386

Los resultados descritos anteriormente demuestran que la fructosa no es una buena alternativa para sustituir la glucosa del medio de cultivo debido a que no puede ser metabolizada tan fácilmente como ésta última, lo cual se ve reflejado en una menor concentración celular. Aún cuando la concentración de ácido láctico final fue menor en el cultivo con 4 g/L de fructosa (2.5 g/L de lactato) con respecto a los cultivos control y con 4 g/L de glucosa (3.7 g/L de lactato) se consideró que, dado el efecto sobre el crecimiento celular, una mejor alternativa era utilizar el medio suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio y 4 g/L de glucosa ya que se logró controlar el pH por más tiempo sin afectar la velocidad específica de crecimiento ni la concentración celular. De esta manera el medio de cultivo utilizado a partir de estos experimentos es el reportado en materiales y métodos.

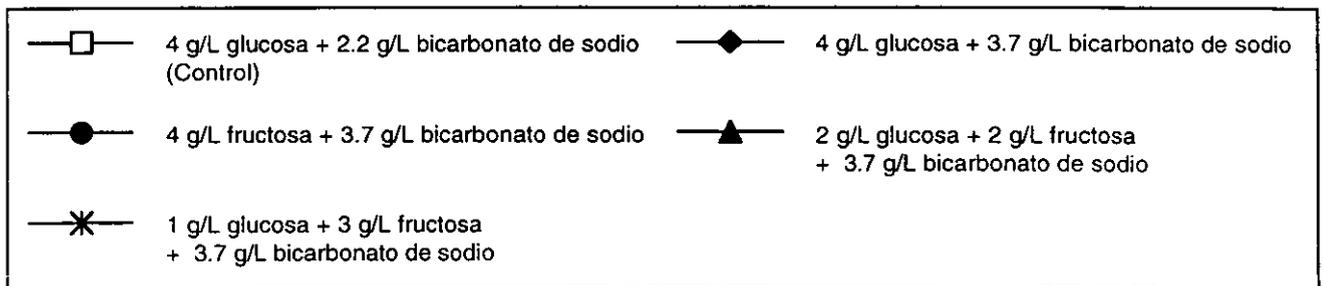
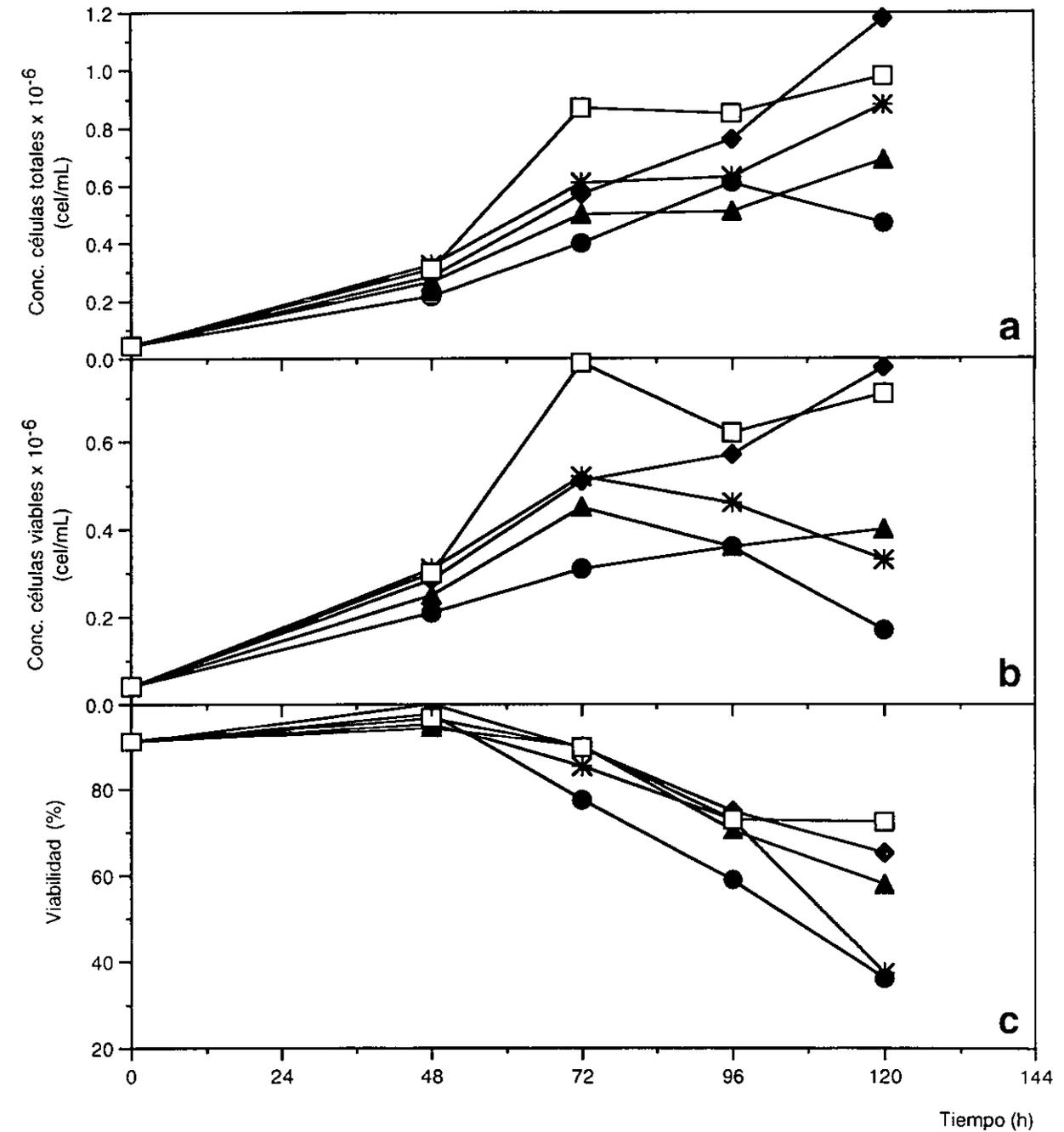


Figura V.1.- Efecto del bicarbonato de sodio y la fructosa sobre la concentración de hibridomas. a) Células totales. b) Células viables. c) % Viabilidad celular.

V.1.2. Caracterización de la muerte celular en cultivos de hibridomas y células de insecto Sf9.

Artículo:

Angélica Meneses-Acosta, Ronaldo Z. Mendonca, Horacio Merchant, Luis Covarrubias, Octavio T. Ramírez (2001). **Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures.** *Biotechnology and Bioengineering*, 72: (4): 441 – 457.

Comparative Characterization of Cell Death Between Sf9 Insect Cells and Hybridoma Cultures

Angélica Meneses-Acosta,¹ Ronaldo Z. Mendonça,⁴ Horacio Merchant,³ Luis Covarrubias,² Octavio T. Ramírez¹

¹Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal. 510-3. Cuernavaca, Mor. 62250, México, telephone: (527) 329-1646 and (527) 329-1617, Fax: (527) 313-8811; E-mail: tonatiuh@ibt.unam.mx

²Departamento de Genética y Fisiología Celular, Instituto de Biotecnología UNAM

³Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

⁴Laboratorio de Inmunología Viral, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil

Received 15 July 2000; accepted 24 October 2000

Abstract: Physiological cell death (PCD) in Sf9 insect cell batch cultures was comprehensively characterized using simultaneous determinations of qualitative and quantitative assays, including agarose gel electrophoresis, confocal, epifluorescence, and transmission electron microscopy, and DNA content by flow cytometry. Results were compared to hybridoma cultures where abundant information of apoptosis exists. Both cultures shared some typical apoptosis features, including cell shrinkage, loss of sphericity, swollen endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, chromatin condensation, and specific DNA degradation. However, distinctive morphological and kinetic differences between both cultures revealed that Sf9 cells died by an atypical PCD process characterized by absence of nuclear fragmentation, scarce association of condensed chromatin to the nuclear envelope, swollen mitochondria, and high nonspecific DNA degradation. These features, distinctive of necrosis, were not observed in the normal apoptotic process of hybridomas. Glucose depletion marked the appearance of apoptotic Sf9 cells, which there up on increased gradually, whereas apoptotic hybridomas rapidly increased upon glutamine depletion. Furthermore, active phagocytosis was found in Sf9 viable cells, a characteristic phenomenon during *in vivo* apoptosis but uncommon for *in vitro* cultures. Sf9 cells contained unusually high numbers of phagosomes, particularly after glucose depletion. Additionally, few apoptotic bodies accumulated in culture, suggesting their elimination by phagocytosis. Other distinctive characteristics of Sf9 cells were the presence of a polynucleated hypertrophic population fraction, polyploidy, cell cycle arrest in G2/M phase, and more necrosis compared to hybridomas. Such phenomena prevented a reliable quantification of apoptosis from determination of the sub-G1 peak. Nonetheless, emergence of a bimodal Sf9 cell size distribution coincided with the increase in the sub-G1 population and onset of death. The fraction of particles in the smaller peak (6–11 μm

diameter) closely correlated with the fractions of apoptotic bodies, late apoptotic, and secondary necrotic cells. Accordingly, Sf9 cell size was shown to be an effective, rapid, and simple parameter for quantifying death. Altogether, the results of this study provide new insights into PCD and other phenomena in insect cell culture important for biotechnological applications of Sf9 cells. © 2001 John Wiley & Sons, Inc. *Biotechnol Bioeng* 72: 441–457, 2001.

Keywords: apoptosis; Sf9 insect cells; hybridomas; agarose gel electrophoresis; electron, confocal, and epifluorescence microscopy; flow cytometry; cell size

INTRODUCTION

The active process of cell death, included in the general term of physiological cell death (PCD) (Schwartzman and Cidlowski, 1993), has been extensively characterized in normal and tumor cells of hematopoietic origin. In particular, information on apoptosis (the best-characterized mechanism of PCD) in hybridoma culture is rapidly accumulating (Fränk et al., 1992; Singh et al., 1994). Induction of apoptosis by various parameters, including nutrient depletion (Mercille and Massie, 1994a; Fassnacht et al., 1997; Simpson et al., 1998), temperature (Nagarathnamma et al., 1997), and concentration of dissolved oxygen (Mercille and Massie, 1994b) and toxic by-products (Westlund and Häggström, 1998), has received special attention. The negative impact of apoptosis in other commercially important mammalian cell lines has been studied only recently. For instance, viral infection has been reported to induce apoptosis in BHK-21, Vero, and other mammalian cells, limiting production of either virus and vaccines, or proteins from viral expression systems (Duncan et al., 1999; Mastrangelo et al., 1999). For other cell lines, such as CHO cells, the presence of apoptosis has been controversial; however, it is now clear that it can be triggered by various conditions, including nutrient depletion (Goswami et al., 1999; Sanfeliu and Stephanopoulos, 1999; Zanghi et al., 1999). Interest-

Correspondence to: O. T. Ramírez

Contract grant sponsors: DGAPA-UNAM and CONACyT 25164-B; CONACyT 23820, FAPESP 95/4218-0.

ingly, some recent studies have reported an atypical PCD in CHO cells, characterized by combined features of apoptosis and necrosis (a passive death process) (Al-Rubeai, 1998; Singh and Al-Rubeai, 1999). Altogether, comprehension of apoptosis in cell culture has resulted in various strategies aimed at preventing it, including the introduction of anti-apoptotic genes and the supplementation of nutrients and antiapoptotic chemicals (Mastrangelo and Betenbaugh, 1998; Fassnacht et al. 1999; Mastrangelo et al., 1999).

Compared to other commercially important cell lines, information on PCD in insect cell culture is less abundant and usually limited to qualitative observations. Most studies have centered on understanding the molecular mechanisms of PCD during culture infection by baculovirus (Clem et al., 1991; Prikhod'Ko et al., 1999). In general, such reports lack detailed quantitative information of insect cell death kinetics and only indicate whether apoptosis is present or not. Internucleosomal DNA fragmentation by analysis on agarose gel electrophoresis is usually employed for determining PCD in insect cell culture (Clem et al., 1991; Prikhod'Ko et al., 1999). However, such an assay is laborious, time-consuming, can yield false negatives or positives, and presents other drawbacks that impede quantitative determinations (Cohen et al., 1992; Collins et al., 1992; Duke and Cohen, 1995). Cell staining by DAPI or Hoechst 33342 can yield quantitative information on PCD, but has only been used for qualitative descriptions of insect cell morphology (Clem et al., 1991; Prikhod'Ko et al., 1999). Only recently have PCD kinetics been quantified for insect cell culture (Cowger et al., 1999). Flow cytometry and fluorescence staining with acridine orange (AO) and ethidium bromide (EB) were used. Other reports have determined DNA content in insect cell cultures by flow cytometry but have not analyzed PCD (Fertig et al., 1990; Schopf et al., 1990; Léry et al., 1999). Flow cytometry can be a powerful method for assessing PCD but the presence of polyploidy in insect cells (Fertig et al., 1990; Léry et al., 1999) can difficult quantitation of the sub-G1 peak by DNA content analysis. Furthermore, flow cytometers are expensive and require experienced personnel for correct data interpretation.

A distinctive hallmark of PCD is the decrease in cell size (Schwartzman and Cidowski, 1993), which can be easily and rapidly determined by equipment generally available in cell culture laboratories. However, the utility of such a parameter for quantifying PCD has been little investigated. Initially, Ohyama et al. (1981) showed that cell volume reduction correlated with the death of rat thymocytes, but no reference to an apoptotic process was indicated. The decrease in cell size and a simultaneous increase in plasma membrane granularity, measured by flow cytometry, was later used for identifying PCD (Duke and Cohen, 1995; Al-Rubeai, 1998). Nevertheless, further studies are still needed since cell cycle phase (Ramírez and Mutharasan, 1990), hydrodynamic forces (Al-Rubeai et al., 1995a, b), pH, temperature, osmolarity, and even virus infection (Schopf et al., 1990) can affect cell size.

Clearly, the various methods for determining PCD have

inherent limitations and only provide a partial description of different apoptosis features. To overcome this, we performed a comprehensive characterization of cell death in uninfected cultures of Sf9 insect cells using various simultaneous qualitative and quantitative assays. Results were compared to hybridomas, which are a convenient benchmark since abundant information on apoptosis is available. The results of this study showed that Sf9 insect cells presented a combined pattern between apoptosis and necrosis, in contrast to hybridomas, where either typical apoptotic or necrotic features could be identified. The utility of cell size determinations for quantifying PCD is also discussed and its correlations with flow cytometry and fluorescent staining results are presented.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, Culture Media, and Cell Cultures

Batch cultures of noninfected insect cells (*Spodoptera frugiperda* (Sf9), ATCC1711) and of a murine hybridoma (Higareda et al., 1997) were studied. TNM-FH and DMEM media were used for insect and hybridoma cell cultures, respectively. TNM-FH was supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Galthersburg, MD) and 0.05% (w/v) Pluronic F-68 (BASF). Final DMEM contained 10% (v/v) FBS, 4 g/L glucose, and 4 mM glutamine. Hybridomas and Sf9 cells were cultured in 1 L (700 mL working volume) bioreactors and 200 mL (50 mL working volume) spinner flasks, respectively. Description of the culture systems, conditions used, and other media components are detailed elsewhere (Higareda et al. 1997; Mendonça et al. 1998).

Determination of Apoptosis

Apoptosis was determined in both cell lines simultaneously using the following methods.

Agarose Gel Electrophoresis

Analysis was performed as described by Smith et al. (1989) except that sucrose was not added to samples and 1.8% (w/v) agarose gels of 25 cm and 2 mM EDTA 40 mM Tris 35 mM sodium acetate pH 8.1 buffer were used. Apoptotic hybridomas induced by 5 µg/mL actinomycin D (Merville and Massie, 1994a) were used as controls.

Transmission Electron Microscopy

1×10^6 cells were centrifuged and the pellet fixed for 1 h at 4°C in 1 mL Karnovsky solution without CaCl_2 . Fixing solution was removed and the pellet stored at 4°C in 0.1 M cacodylate buffer until sample processing. Samples were postfixed in 1% (w/v) osmium tetroxide for 1 h, washed twice with distilled water, dehydrated in a graded series of

ethanol solutions from 70–100%, and resuspended in 100% propylene oxide. Cells were embedded in epoxy resin by successive 1-h incubations of 1:1 and 2:1 resin:propylene oxide, and polymerized by incubating at 60°C for 48 h in 100% epoxy resin. 0.05–0.1 μm sections were stained in 2.5% (w/v) uranyl acetate and 0.3% (w/v) lead citrate and viewed in an M-Jeol 1010 electron microscope.

Staining by Fluorescent Dyes

Cells were stained with acridine orange (AO) and ethidium bromide (EB) and classified from visual examinations in epifluorescent and confocal microscopes as viable, early apoptotic, late apoptotic, apoptotic bodies, and necrotic. Cell staining and epifluorescence microscopy was performed as described by Mercille and Massie (1994a). Confocal microscopy was performed in a Bio-Rad MRC-600 microscope (Kr/Ar laser, 1% laser transmission, 60% confocal aperture, and 100X objective). The filters used were a 488 nm for excitation and 510 nm and 568 nm for AO and EB emission, respectively.

Flow Cytometry

1×10^6 cells were centrifuged, fixed in cold 70% ethanol, and stored below -14°C . Prior to analysis, ethanol was removed (1,300g, 5 min) and cells were incubated at room temperature in 1 mL of buffer A (1 g/L citric acid, 0.1% (v/v) Nonidet p-40, 522 $\mu\text{g}/\text{mL}$ spermine tetrahydrochloride, and 60.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trizma hydrochloride pH 7.6) containing 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ porcine pancreas trypsin. After 10 min, 1 mL of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsinogen and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ribonuclease A in buffer A was added. After 10 min, 1 mL of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide and 1.16 mg/mL spermine tetrahydrochloride in buffer A was added and incubated at 4°C for 10 min. During each incubation, samples were vortexed intermittently every 2 min. 10,000 nuclei were processed in a FAC-Scan Becton Dickinson (Ar laser, 488 nm and 620 nm excitation and emission wavelengths, respectively) and results were analyzed with ModFit LT (Verity) software. Instrument settings were fixed using 100% viable hybridoma or insect cells.

Other Assays

Total cell number and cell size distribution were determined in a Coulter Counter Multisizer II (Coulter Electronics) using a 100 μm aperture tube. In addition to AO and EB staining, viability was also determined by Trypan blue exclusion. Glucose and glutamine concentration were determined enzymatically in a YSI 2700 analyzer (Yellow Springs Inst.). All media, supplements, and reagents used in cell cultures and assays were from Sigma (St. Louis, MO), except where indicated.

RESULTS

Agarose Gel Electrophoresis

Most reports of PCD in insect cell culture are based on agarose gel electrophoresis determinations of the oligonucleosomal fragments that result from DNA degradation by an endonuclease. However, as reported recently (Singh et al., 1994; Al-Rubeai, 1998), such a technique can fail to identify PCD in Sf9 cells and other cells exhibiting atypical features. That is, a smear of DNA caused by nonspecific degradation is obtained rather than the typical ladder pattern of DNA fragments of ca. 180 basepair multiples. In our case, PCD was readily determined in hybridomas when using a general protocol which includes DNA extraction with isopropanol (Duke and Cohen, 1995). In contrast, only a smear was obtained when applying such a method to Sf9 cells taken from various growth phases (data not shown). DNA fragmentation was observed in both cultures if an alternative protocol (see Materials and Methods) was used (Fig. 1). Such a protocol reduced nonspecific DNA degradation due to absence of the harsh isopropanol extraction step. The typical DNA ladder appeared in insect cells after 192 h of culture (Lane 6, Fig. 1A), whereas for hybridomas it was detected as early as 108 h (Lane 8, Fig. 1B). In both cases the content of high molecular weight DNA decreased as culture time increased and at least six clearly identifiable DNA fragments of molecular weights between 200 to 1,200 bp could be detected (arrows in Fig. 1). An increasing fraction of apoptotic-like cells as culture time increased could be inferred in both cases from an increasing intensity of lower-weight DNA bands, but inherent limitations of the technique prevented any reliable quantification. Nonspecific DNA degradation occurred in both cases as culture times increased; however, it was more pronounced in insect cells. This indicates that a necrotic-like process was more predominant in Sf9 cells. It should be noted that in this study PCD was spontaneously triggered in both cultures by nutrient depletion (glucose or glutamine).

Transmission Electron Microscopy

Electron microscopy (EM) is still by far the best way to unequivocally determine the morphological features of apoptosis. In fact, PCD in cells of hematopoietic origin has been previously characterized by EM (Al-Rubeai et al., 1990, 1995a; Singh et al., 1994). Although EM has been used to detect PCD during development of complete insects (Martau and Romer, 1998), EM studies of insect cells in culture are notoriously absent. Accordingly, the morphological features of insect cells during the various growth phases were determined by EM (Figs. 2, 3) and compared to those of hybridomas (Fig. 4). Two different populations of viable cells were identified in Sf9 cell cultures: one uninucleated (Fig. 2A), and another polynucleated (Fig. 2B). In both populations the nuclei (n) appeared roundish with some invaginations. Viable insect cells displayed nuclei

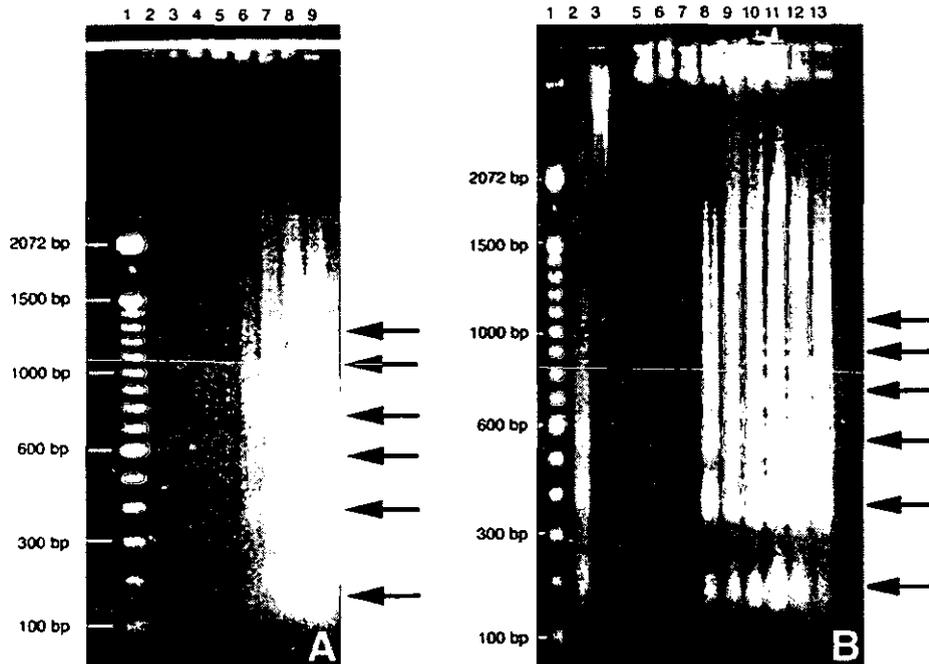


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of DNA at various culture stages. A: Sf9 insect cells. Lanes: 1, 100 bp ladder MW marker; 2, 48 h; 3, 96 h; 4, 120 h; 5, 168 h; 6, 192 h; 7, 216 h; 8, 240 h; and 9, 264 h. B: Hybridoma cells. Lanes: 1, 100 bp ladder MW marker; 2, apoptosis control; 3, viable cells control; 5, 0 h; 6, 96 h; 7, 103 h; 8, 108 h; 9, 120 h; 10, 132 h; 11, 144 h; 12, 152 h; 13, 168 h. Arrows indicate the specific DNA degradation fragments of 150 bp multiples

containing small clusters of heterochromatin (black arrows) rarely associated to the inner surface of the nuclear envelope (Fig. 2B). In some viable cells (Fig. 2A), regular spots of condensed chromatin (black arrows) and a well-defined nucleolus (nl) appeared distributed throughout the nucleus. Such spots, as well as the absence of a mitotic spindle, suggest that this cell line may divide by an amitotic process. Sf9 cells showed a variable number of phagosomes (black arrowheads) and mitochondria (m) with tubular cristae, scarce cisternae of rough endoplasmic reticulum, and a conspicuous Golgi apparatus (Ga). The size of mitochondria varied considerably among the cells analyzed. In contrast to viable insect cells, viable hybridomas (Fig. 4A) exhibited a multilobular nucleus with large clusters of heterochromatin (black arrows) associated to the nuclear envelope and a large nucleolus. A highly heterochromatic nucleus does not necessarily indicate low transcriptional activity (Cross and Mercer, 1993). Hybridomas had a well-developed rough endoplasmic reticulum and a Golgi apparatus, similar to other protein-secreting cells (Cross and Mercer, 1993). Several mitochondria (m) with lamellar cristae were distributed in the cytoplasm and only few secondary lysosomes (black arrowheads) were observed.

The death process of Sf9 cells is shown in Figures 2C and 3. Some apoptotic features, such as cell shrinkage, loss of cell sphericity, and chromatin condensation (black arrows), can be seen during early death phase (Fig. 2C). In some

cells a swollen endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, forming structures resembling small vacuoles, was also detected. Although chromatin condensation was observed, very little was associated to the nuclear envelope, which contrasts to a typical apoptotic process. Highly swollen mitochondria (m), characteristic of necrosis, and a high content of phagosomes (black arrowheads) were also observed. Cells showing this morphology, but still maintaining the plasma membrane integrity, were identified as early apoptotic (EA)-like cells. For comparison, two successive stages of EA hybridomas are shown in Figure 4B,C. EA hybridomas exhibited typical apoptotic features such as cell shrinkage, loss of cell sphericity, a high chromatin condensation near the perinuclear space, nuclear fragmentation (nf), and intact mitochondria. Nuclear fragmentation and appearance of autophagic bodies (black arrowheads) preceded chromatin condensation and changes in morphology of organelles (Fig. 4B). Swelling of endoplasmic reticulum, chromatin condensation associated with the perinuclear region, and nuclear fragmentation were more pronounced in the stage shown in Fig. 4C. In contrast to Sf9 cells, hybridomas presented some cell blebs surrounding nuclear fragments (b, Fig. 4C) which could later originate apoptotic bodies (AB).

In a later death phase, designated late apoptotic-like (LA, Fig. 3A), plasma membrane integrity of insect cells was lost and the main cytoplasmic contents had leaked out. Very swollen mitochondria along with phagosomes remained

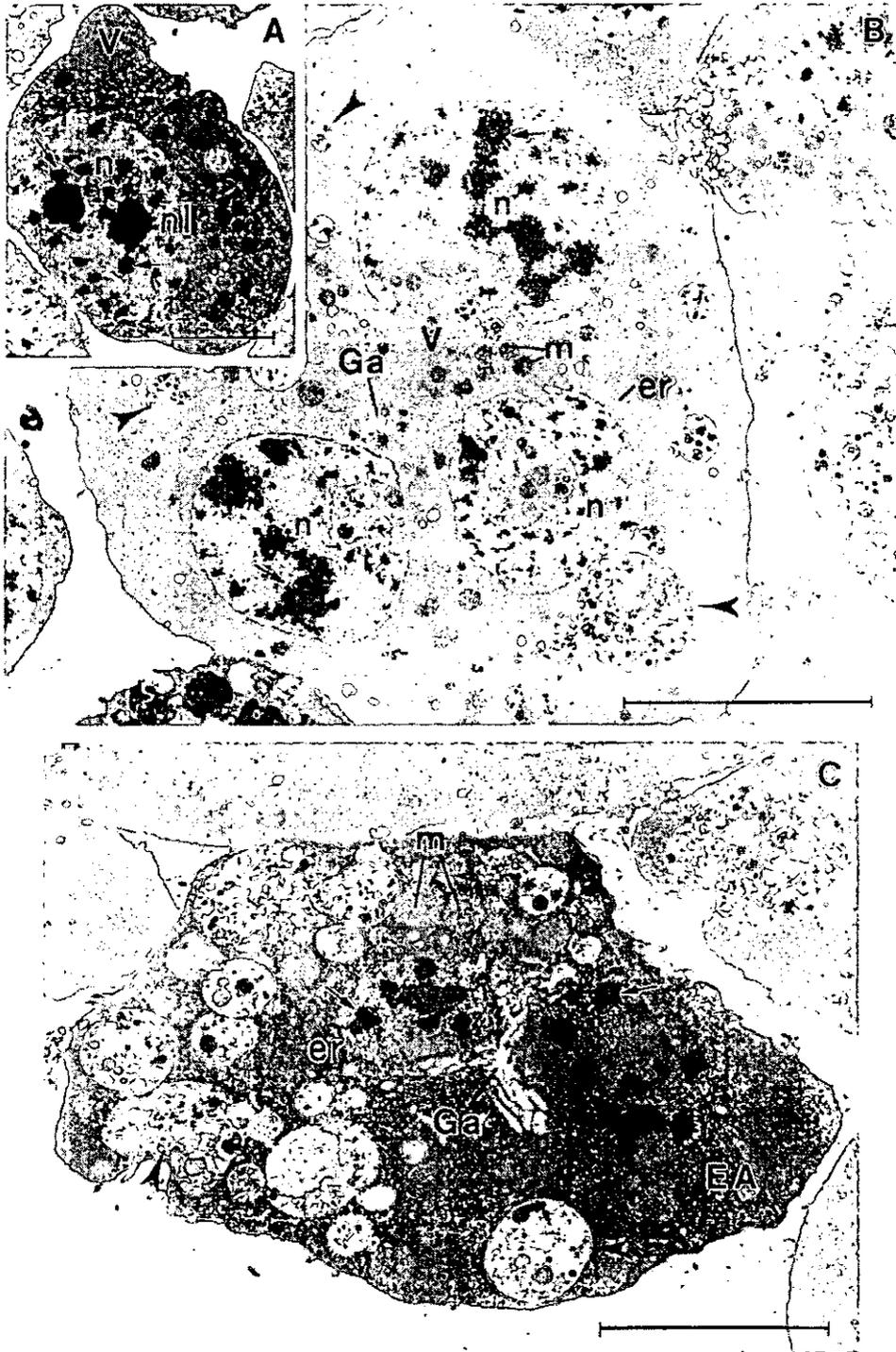


Figure 2. Transmission electron microscopy of viable and early death phase of Sf9 insect cells. **A:** Uniuucleated viable cell. Chromatin condensation (black arrow). Scale bar = 4 μm . **B:** Polynucleated viable cell. Heterochromatin (black arrow). Scale bar = 10 μm . **C:** Early apoptotic cell (EA) with some atypical PCD characteristics. Scale bar = 4 μm . er, endoplasmic reticulum; Ga, Golgi apparatus; m, mitochondria; n, nucleus; phagosomes (black arrowheads).

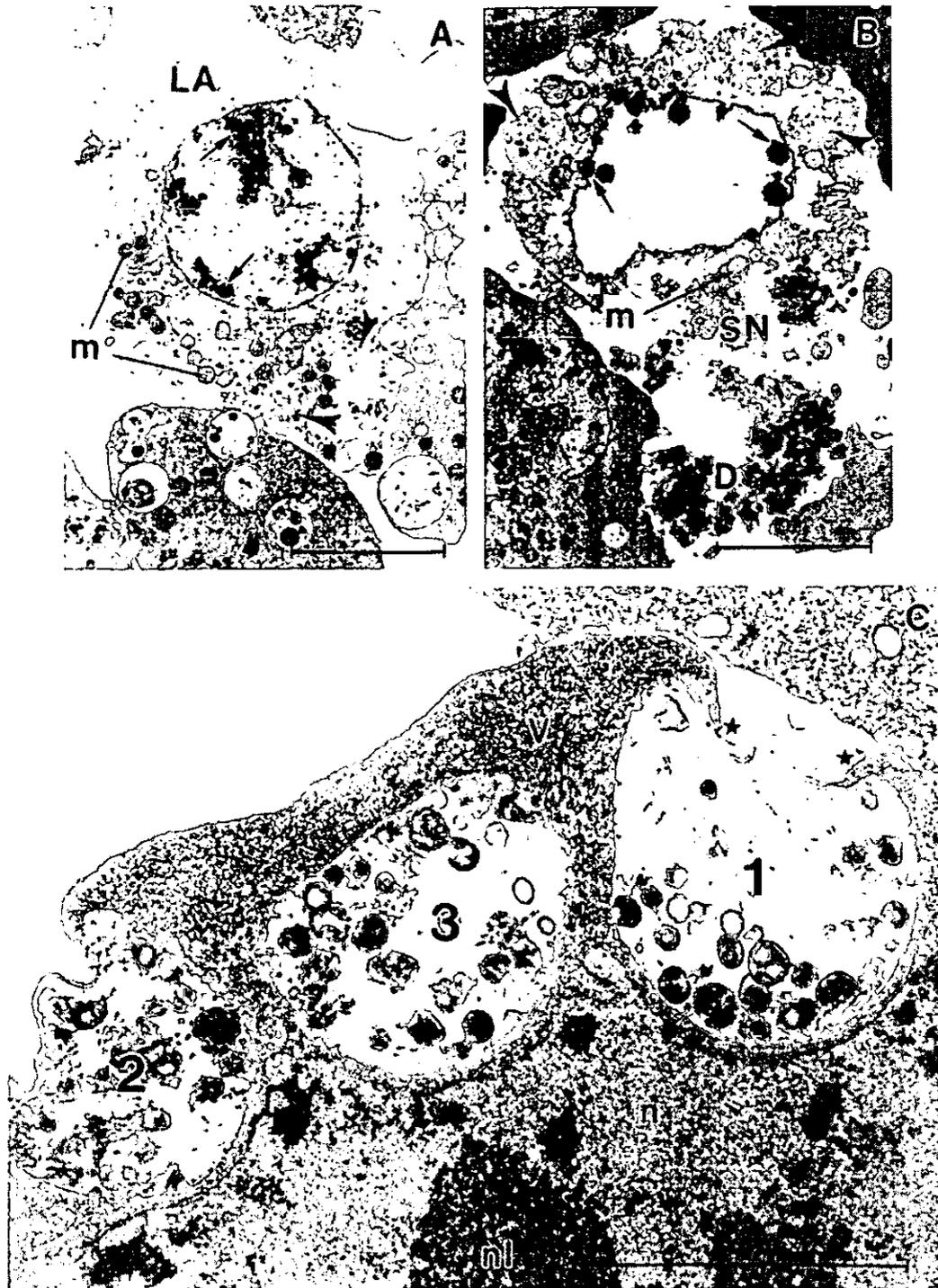


Figure 3. Transmission electron microscopy of different stages of cell death and phagocytic process of cell detritus in Sf9 insect cells. A: Late apoptotic cell (LA) with intact nuclear envelope and condensed chromatin. Scale bar = 6 μ m. B: Very late death phase, a secondary necrotic cell (SN) without cytoplasmic membrane, maximum chromatin condensation, and swollen organelles. Cell contents have leaked out to the medium. Scale bar = 6 μ m. C: Sequence of active phagocytosis of debris by a viable cell. 1. Initial cytoplasmic process during early phagocytosis (stars). 2. Cytoplasmic flickering. 3. Final internalization of phagocytic vesicle. Scale bar = 2.5 μ m. Heterochromatin and condensed chromatin (black arrows); m, mitochondria; n, nucleus; nl, nucleolus; phagosomes (black arrowheads).

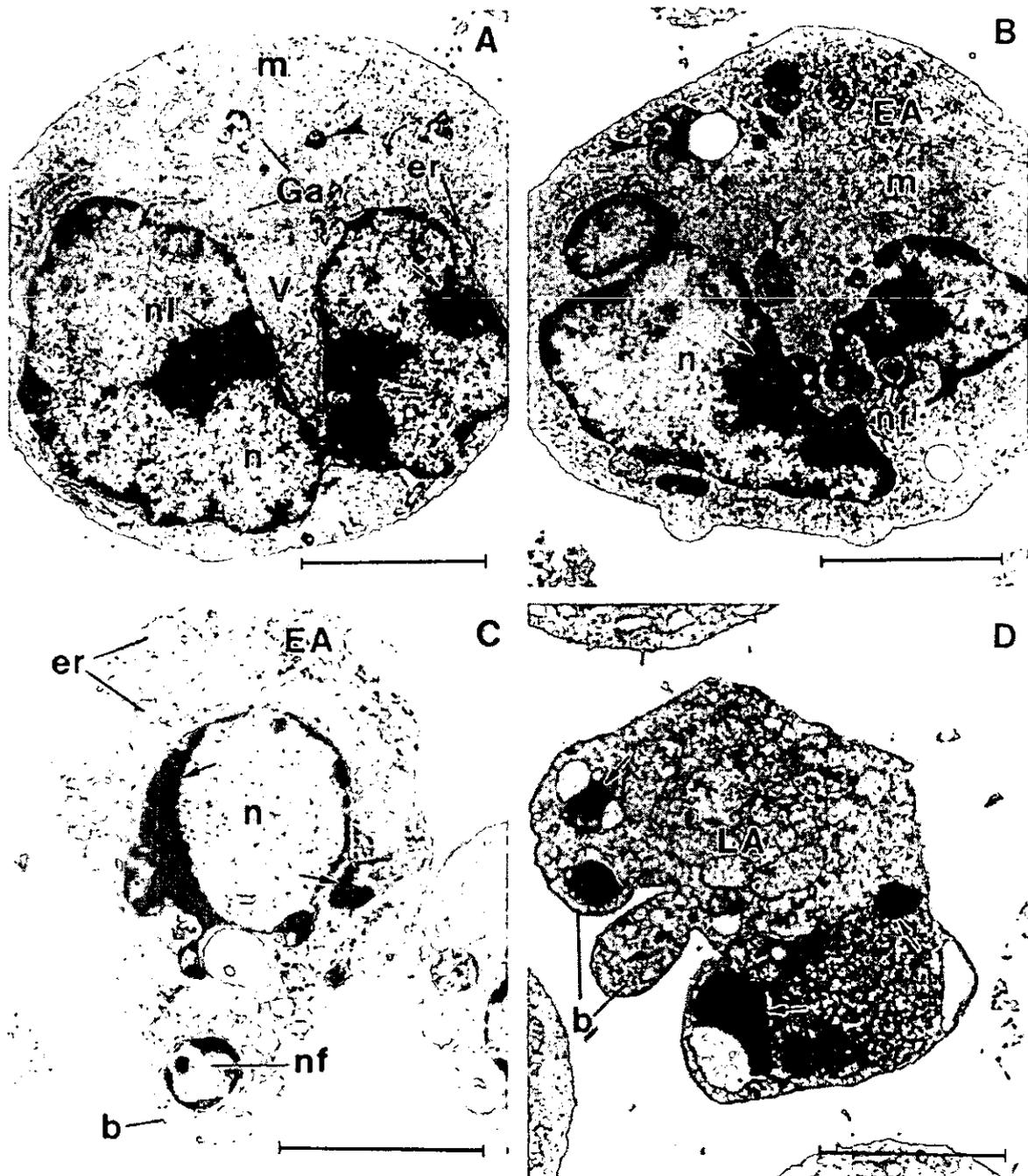


Figure 4. Transmission electron microscopy of hybridoma cells at various cultures stages. A: Viable cell. B: Early apoptotic cell (EA). A very early stage of apoptosis is shown where initiation of nuclear degradation preceded any change in other organelles. C: Early apoptotic cell (EA) with a swollen endoplasmic reticulum (er), nuclear degradation and chromatin condensation. D: Late apoptotic cell (LA). Nuclear degradation and loss in the shape of organelles is shown. b, cell blebs; heterochromatin and condensed chromatin (black arrows); Ga, Golgi apparatus; secondary lysosomes (black arrow heads); m, mitochondria; n, nucleus; nf, nuclear fragmentation; nl, nucleolus. Scale bar = 5 μ m.

within the cell, the nuclear envelope remained intact, and more chromatin was condensed compared to EA-like cells. Nonetheless, nuclear fragmentation, a typical characteristic of apoptosis, was not observed even in the most advanced phases of death. In comparison, nuclear fragments dispersed throughout the cytoplasm and completely irregular cell shapes were observed in LA hybridomas (Fig. 4D). As in LA-like insect cells, LA hybridomas had also lost their membrane integrity. Organelles in LA hybridomas could not be clearly identified due to excessive internal swelling. Formation of AB from cell blebbing was evident and chromatin condensation in the perinuclear space (black arrows) was maximum.

In a very advanced phase of death (Fig. 3B), the plasma membrane of Sf9 cells was disintegrated and, consequently, a large amount of cellular debris was observed, but only few apoptotic bodies (data not shown) were detected in all the culture. Furthermore, most organelles were swollen. Chromatin condensation now appeared near the nuclear envelope and was at its highest and a large amount of vacuoles was detected. These characteristics reflect that PCD was in progress before cell degradation occurred. Thus, such a stage was designated secondary necrotic to differentiate it from a purely necrotic death. As in the case of insect cells, degradation of hybridomas occurred during the latest death stages.

A distinctive feature observed in all growth phases was the presence of various amounts of phagosomes (black arrowhead), indicating the elimination of cell debris by an active phagocytic process (Fig. 3). Three consecutive stages of such a process, simultaneously occurring in the same cell, are shown in Figure 3C: cytoplasmic invagination around extracellular debris (stage 1); flickering process during phagosome internalization (stage 2); and a completely formed internal phagosome (stage 3). Interestingly, after glucose depletion (96 h) and before viability decreased below 90% (158 h), the number of phagosomes increased notably. In some cells, phagosomes constituted more than 50% of the cell volume (data not shown). Contrary to Sf9 cells, AB were clearly observed in hybridoma cultures. Two types of apoptotic bodies were identified—some of them showed chromatin fragments, while others only contained organelles (data not shown).

Staining by Fluorescent Dyes

Epifluorescence microscopy (EFM) is a rapid, simple, inexpensive, and quantitative assay for identifying PCD. However, meaningful details given by EM are lost during EFM, making data interpretation difficult and consequently yielding subjective results in some cases. Accordingly, PCD was quantified by cell staining with AO and EB and the observed features were confirmed through EM data. In addition, EFM was compared to confocal microscopy (CM), as the latter provided a substantially better resolution, particularly of the nucleus. Under EFM, viable Sf9 cells can be seen uniformly stained in green (Fig. 5A). Successive stages

of chromatin condensation, previously unreported for Sf9 cells, were identified as an increasing granularity and definition of the nucleus (Fig. 5AI–5AIV). Viable uninucleated and polynucleated cells are shown in Figures 5A and 6A, respectively, confirming the EM observations (Fig. 2A,B). As described before (Fig. 2), viable Sf9 cells presented regularly dispersed chromatin and only small amounts of heterochromatin. This explains why Sf9 cells appeared stained with uniformly dispersed spots when observed under EFM. In contrast, viable hybridomas (Fig. 7A) appeared stained with a larger diffuse nucleus, probably due to dye accumulation in zones with a higher chromatin density (see also Fig. 4A). This resulted in a higher fluorescence intensity that prevented good definition. The same phenomenon was observed under CM (Fig. 8A). When using CM, the nucleus was clearly defined for viable Sf9 cells but not for hybridomas (Figs. 6A, 8A). Red regions, observed in both cell lines, could correspond to RNA or single-stranded DNA stained by AO.

Early apoptotic-like Sf9 cells also presented slight chromatin condensation, observed as yellow spots in the nucleus, but cell blebs could now be readily identified (Fig. 5BI). Such a morphology coincided with that reported by Cowger et al. (1999). In a different stage, an increase of granularity in the cytoplasm was detected (Figs. 5BII, 6B), probably due to nuclear material contained in the phagosomes previously identified by EM (Fig. 2C). Cell blebbing, nuclear fragmentation, and loss of cell sphericity, observed by EM (Fig. 4C) in EA hybridomas, were also detectable by EFM and CM (Figs. 7B, 8B). Increased cell blebbing preceded the appearance of AB. In contrast to Sf9 cells, successive stages of EA hybridomas were not detected.

As membrane integrity was lost, EB entered the cells, staining their nuclei red. Progressive stages of late apoptosis (Figs. 5CI–5CIII, 6C) and secondary necrosis (SN, Fig. 5CIV) could then be detected in Sf9 cells. In comparison, primary necrotic cells (N, Fig. 5D) resembled viable cells but stained red. LA-like cells resembled EA cells but with the nucleus stained red, whereas SN cells were distinguished as those with a very disintegrated plasma membrane and chromatin condensation. This latter characteristic is the difference between SN and primary necrotic cells (N). Similar features were observed for LA and N hybridomas (Figs. 7C,D, 8C,D). No nuclear fragmentation was observed in the various stages of viable, necrotic or apoptotic-like Sf9 cells, as also detected by EM and confirmed by CM (Fig. 6). Interestingly, a black halo surrounding the nucleus of LA-like and SN cells was detected (Fig. 6D), indicating that nuclear condensation was maximum at such stages.

To our knowledge, only Cowger et al. (1999) have done quantitative characterization of death kinetics in Sf9 cells. Thus, to expand the available information, kinetics of cell death were followed by EFM. As shown in Figure 9, a small percentage of apoptotic-like Sf9 cells could be detected only after 72 h of culture, whereas apoptotic hybridomas could be detected as early as 24 h. In both cultures EA cells never exceeded 25%, which may indicate a rapid transition to LA

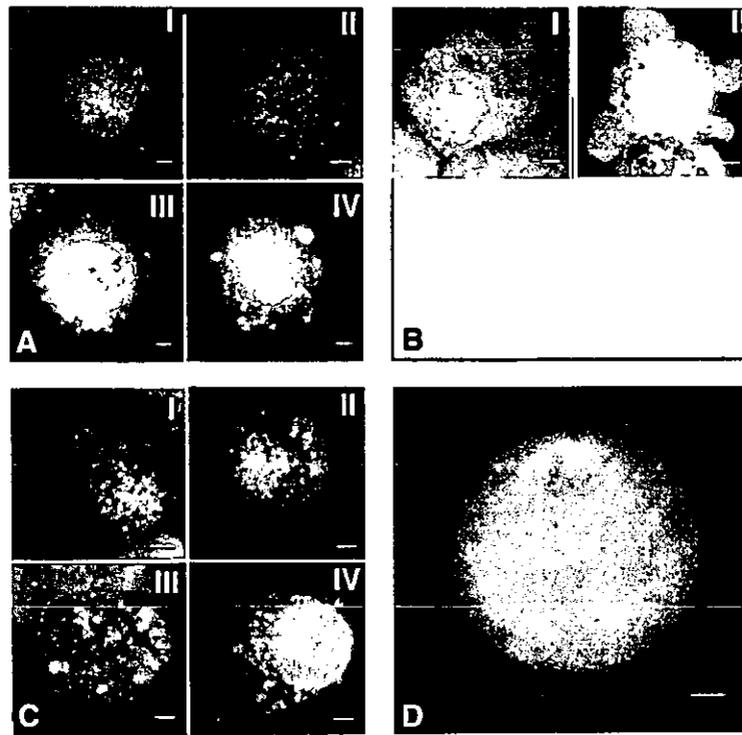


Figure 5. Identification of the various *Sf9* insect cell populations by epi-fluorescence microscopy. A) Viable cells. Successive stages of chromatin condensation (I to IV). B) Early apoptotic cells. Slight chromatin condensation and cell blebbing (I) and increased cytoplasmic granularity (II). C) Late apoptotic cells. Successive stages of the late apoptotic process (I to III) and a secondary necrotic cell (IV). D) Primary necrotic cell.

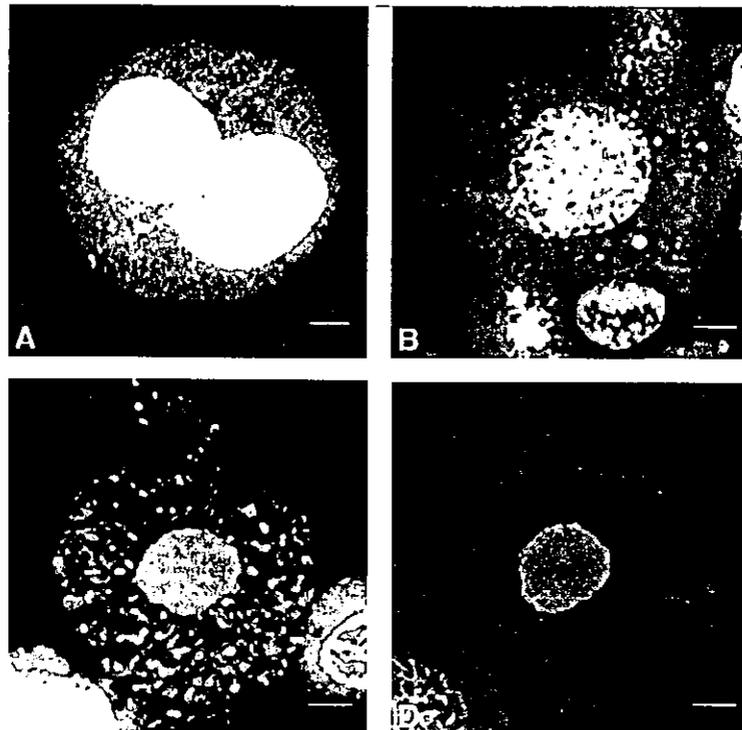


Figure 6. Identification of the various *Sf9* insect cell populations by confocal microscopy. A) Viable polynucleated cell. B) Early apoptotic cell. C) Late apoptotic cell. D) Secondary necrotic cell. Colors are the superimposition between green and red filters. Magnification bar = 2 μ m.

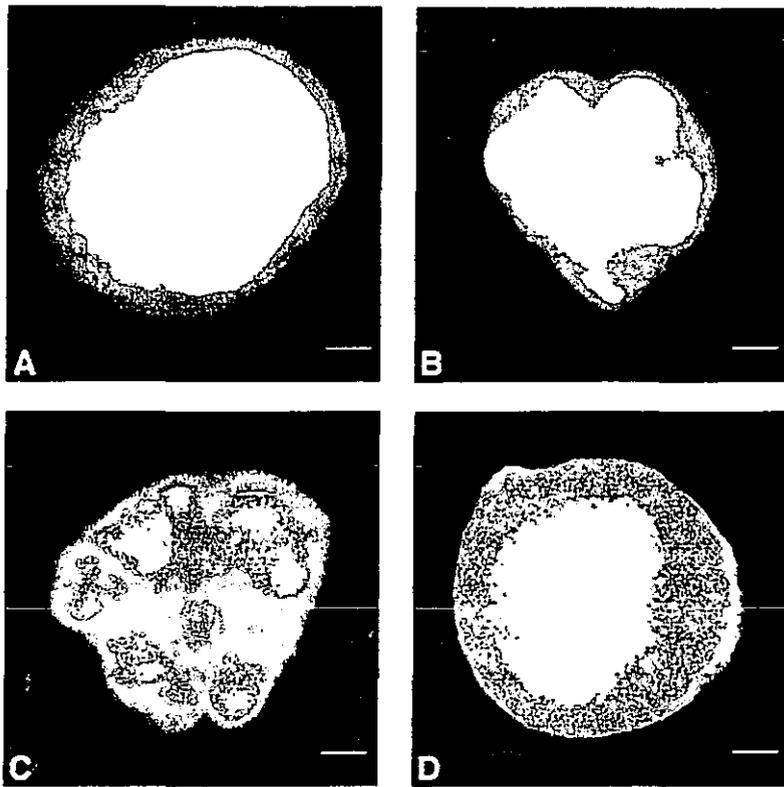


Figure 7. Identification of the various hybridoma populations by epifluorescence microscopy. A: Viable cell. B: Early apoptotic cell. C: Late apoptotic cell. D: Primary necrotic cell. Scale bar = 2 μ m.

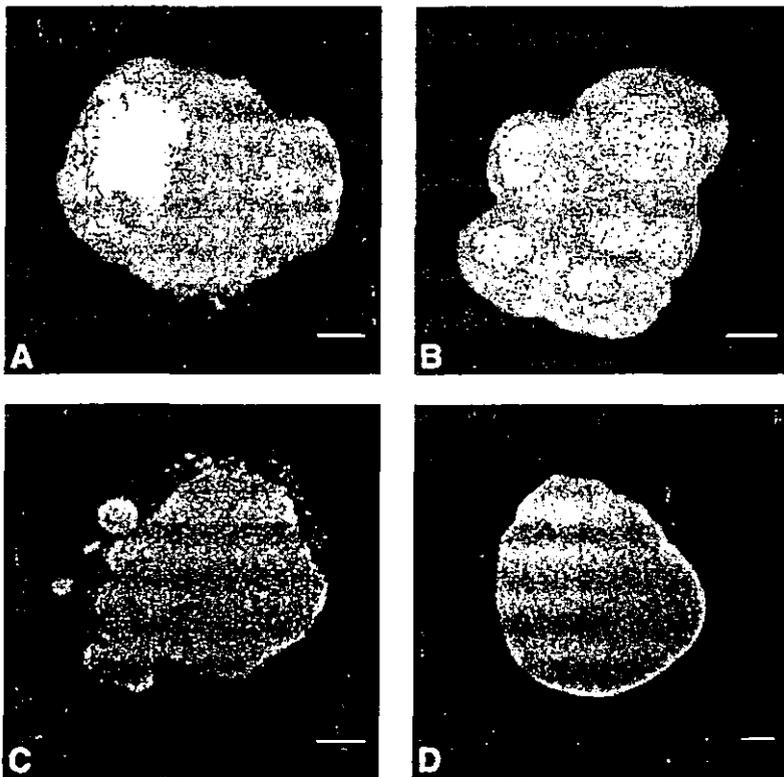


Figure 8. Identification of various hybridoma populations by confocal microscopy. A: Viable cell. B: Early apoptotic cell. C: Late apoptotic cell. D: Primary necrotic cell. Colors are the superimposition between green and red filters. Scale bar = 2 μ m.

or a direct transition to SN. The fraction of LA-like and necrotic (mainly SN) Sf9 cells markedly increased after 192 h, the latter being the most predominant at the end of the culture. The larger fraction of N Sf9 cells compared to hybridomas contributes to the nonspecific DNA degradation observed in agarose gel electrophoresis, discussed above. In contrast, at the end of hybridoma cultures late apoptotic cells were predominant, whereas the fraction of N (mainly primary) cells never exceeded 10%. Only a small fraction of AB was determined for Sf9 cultures at any time (less than 8%), whereas a higher fraction was detected in hybridoma cultures (above 20% at the end of the culture). Apoptotic-like Sf9 cells were clearly identified after glucose depletion at 96 h (Fig. 9B), thereupon the total fraction of AB, EA-like, and LA-like cells gradually accumulated. In comparison, apoptosis induction in hybridomas correlated with glutamine depletion (Fig. 9D), as observed by a sudden increase of the total fraction of AB, EA, and LA cells at 96 h (Fig. 9C). This is in agreement with previous reports (Singh et al., 1994; Mercille and Massie, 1994a). Determination of cell viability by Trypan blue exclusion is also shown in Figure 9. It can be seen that viability was overestimated in both cell lines when using such a technique compared to fluorescence staining with AO/EB.

Flow Cytometry

Determination of DNA content by flow cytometry has been employed as a powerful method for quantifying PCD in mammalian cell culture (Al-Rubeai et al., 1991). Such a method is based on quantifying the cell population contained in the so-called "sub-G1" peak. Few reports of DNA quantitation by flow cytometry are available for insect cell culture (Fertig et al., 1990; Schopf et al., 1990; Léry et al., 1999) and few have employed such a method for assessing PCD (Cowger et al., 1999). Accordingly, we analyzed DNA content of Sf9 cells by flow cytometry and compared it to hybridomas to determine its utility for assessing PCD. Typical DNA histograms of Sf9 cells and hybridomas are shown in Figures 10 and 11, respectively. Data at two culture stages, before and after PCD had occurred, are shown for each cell line. Three peaks at 2n, 4n, and 8n DNA content were detected in Sf9 cells at all culture stages, irrespective of the presence of PCD (Fig. 10). Nuclei of the 8n population were larger and more rugous than those at 4n (data not shown). Furthermore, the 8n peak did not correspond to possible measurements of 4n doublets, since no nuclei aggregates were detected by light microscopy. This indicates that a tetraploid Sf9 population exists which may be independent of the polynucleated population identified by microscopy (Figs. 2B, 6B). A population fraction was observed in tetraploid DNA synthesis phase (St) before and after detection of PCD by other methods (Fig. 10), although it was lower than the fraction at diploid DNA synthesis phase (Sd). As culture time increased the 4n peak increased (see also Fig. 12A). In contrast to Sf9 cells, typical diploid DNA histograms were obtained for hybridomas (Fig. 11). A

relatively high Sd phase was observed (Fig. 11A), which is common in malignant cells, and a sub-G1 peak was clearly identified after the onset of PCD (Fig. 11B).

The distribution of cell cycle phases during batch cultivation of Sf9 and hybridoma cells is shown in Figure 12A,B, respectively. For Sf9 cells, the predominant population corresponded to the 4n peak, which increased from around 40 to 70% during the first 168 h of culture. This indicates that cell cycle arrest occurs at the 4n peak, which coincides with the observations of Fertig et al. (1990). The 2n and 8n peaks reached a maximum of 14% and 18% at 72 h and 48 h, respectively. Fertig et al. (1990) also reported that the 2n peak increased during the growth phase of the culture. After reaching their maximum value, the 2n, 4n, and 8n peaks decreased to 5%, 25%, and 2%, respectively, at the end of the culture. The fraction of cells in Sd and St continuously decreased from their initial values of 21% and 14%, respectively, to almost 0% at the end of the culture, reflecting the progressive decrease of cell growth (see also Fig. 9A). The sub-G1 population in Sf9 cells remained below 7% during the first 168 h and then increased to its maximum value of 65% at the end of the culture. In comparison, hybridomas in 2n increased from 26 to 46% during the first 5 days of culture, whereas about half of the population remained in Sd phase during the first 4 days. Upon glutamine depletion (96 h, Fig. 9D) Sd suddenly decreased, which is in agreement with previous reports (Ramírez and Mutharasan, 1990). The 4n phase in hybridomas remained almost constant and below 15% during all the culture. An evident increase in the sub-G1 hybridoma population was also observed after glutamine depletion. This population represented about 55% at the end of the culture.

Cell Size

One of the most distinctive features of apoptosis is the decrease in cell size, which can be readily determined with an electronic particle counter. However, only scarce quantitative information exists correlating cell size with apoptosis. Accordingly, variations in cell size with respect to culture age were determined and their utility for quantifying PCD was investigated. Typical size distribution profiles of Sf9 cells are shown in Figure 13A. A unimodal distribution, with a constant mean cell diameter of around 15 μm and a relatively broad average standard deviation of 2.5 μm , was observed during the first 168 h. Interestingly, a second peak, with particle sizes between 6 and 11 μm , appeared after 192 h. The size of the second peak steadily increased with culture time. At 216 h the fraction of particles in both peaks was equal, whereas at the end of the culture only ca. 30% of the particles remained in the first peak. The mean diameter of cells in the first peak remained relatively constant and never decreased by more than 10% of its maximum value. A remarkably different behavior was observed for hybridomas, where a unimodal size distribution profile with a relative narrow average standard deviation of 1.8 μm was ob-

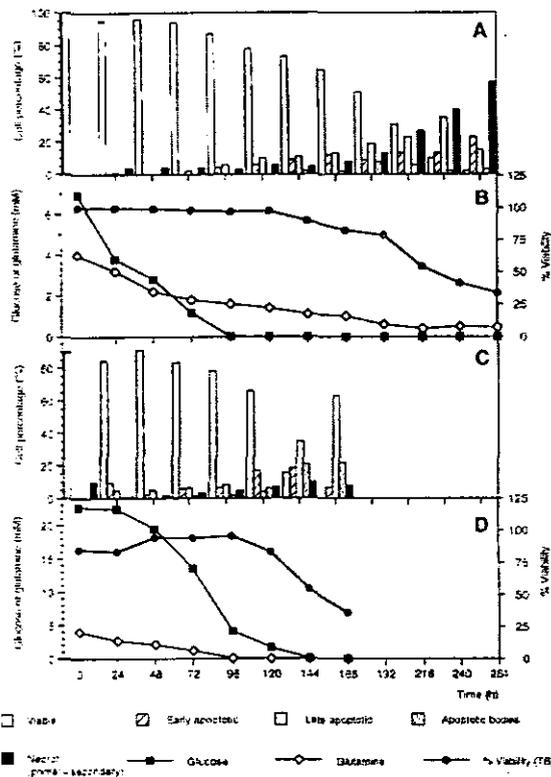


Figure 9. Kinetics of apoptosis as determined by fluorescent staining. A, B: Sf9 insect cells. C, D: Hybridoma cells.

tained throughout the culture (Fig. 13B). Furthermore, the mean cell diameter remained relatively constant between 13.5–14.5 μm only during the first 72 h, but then steadily decreased after glutamine depletion. The maximum decrease in cell diameter was 30% at the end of the culture. A similar decrease has also been reported by Ohyama et al. (1981) for rat thymocytes.

Emergence of the second peak, shown in Figure 13A, coincided with the decrease in the 4n fraction and increase in the sub-G1 fraction (Fig. 12A), indicating that such a peak corresponded to apoptotic cells. Direct measurements in EFM corroborated that most AB, LA-like, and necrotic cells in Sf9 cultures had a diameter between 6–11 μm . Furthermore, as shown in Figure 14A, a very close linear correlation was obtained between the population fraction contained in the second peak and the sum of the fractions of AB, LA-like, and necrotic cells. The latter fraction could be slightly underestimated since particle sizes below 5 μm were not considered due to the presence of large amounts of debris. As mentioned previously, at the end of Sf9 cultures most cells were SN, which are smaller than N cells. An Sf9 cell population with a relatively large and constant diameter (first peak in time of Fig. 13A) is consistent with an arrest at the G2/M phases. In contrast, a hybridoma population

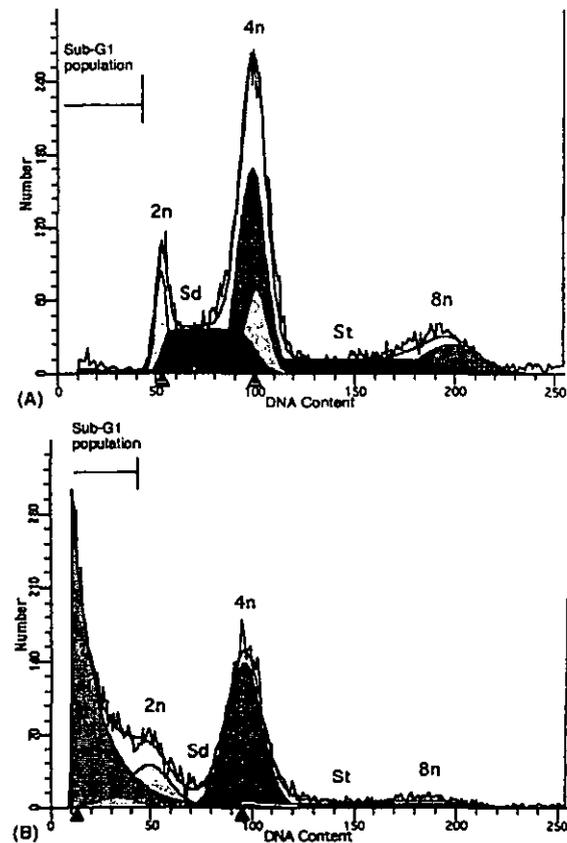


Figure 10. Typical DNA content histograms of Sf9 insect cells as determined by flow cytometry. A: 96 h, midexponential phase. B: 216 h, death phase.

with a continuously decreasing mean cell diameter (Figs. 13B, 14B), even when viable cells were predominant (24–120 h), is consistent with an arrest at the G1/G0 phases. As shown in Figure 14B, the decrease in hybridoma diameter preceded in a nonlinear way the increase in AB, LA, and N cells. Since N cells never exceeded 10%, a similar conclusion would be reached if only SN cells are considered.

As shown in Figure 14A, the sub-G1 fraction of Sf9 cells remained relatively constant and below 7% during the first 168 h, whereas AB, LA-like, and necrotic cells (mainly SN) steadily increased from 24 h. After 168 h the correlation between EFM and flow cytometry improved considerably, although the latter still yielded lower values than the former. It is reasonable to assume that towards the end of the culture most necrotic cells should fall in the sub-G1 population, but this was not observed. Namely, at 264 h only 65% of the population corresponded to the sub-G1 fraction compared to 41% typical apoptotic-cells and 57% necrotic (mainly SN) cells as detected by EFM (see also Fig. 9A). A similar behavior was observed for hybridoma cultures (Fig. 14B).

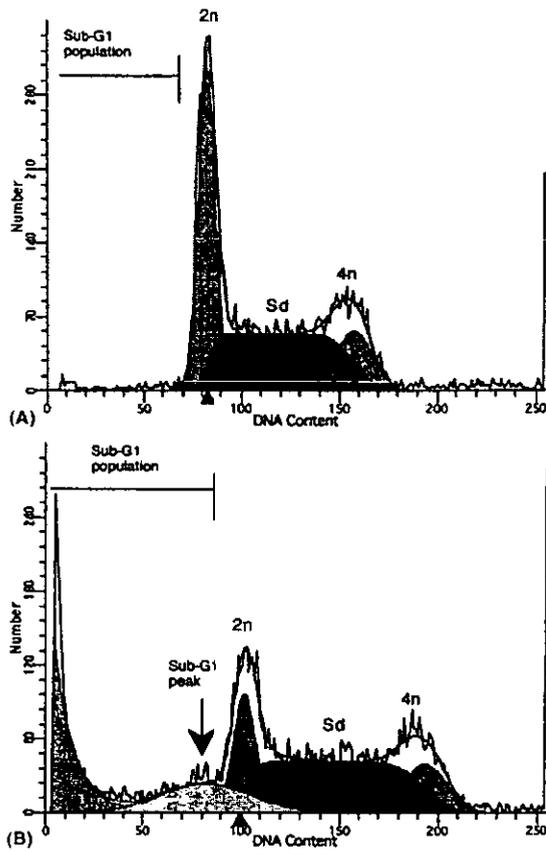


Figure 11. Typical DNA content histograms of hybridoma cells as determined by flow cytometry. A: 48 h, midexponential phase. B: 144 h, death phase.

DISCUSSION

The polynucleated viable Sf9 cell population observed by EM probably originated from a karyokinetic process without cytokinesis. This could result, as in other cell lines (Alberts et al., 1994), in a population of hypertrophic cells that probably does not survive for a long time. The amitotic division process observed in some cells can explain why Fertig et al. (1990) as well as us have failed to arrest insect cells by colcemid (known to block mitotic spindle). In agreement with Fertig et al. (1990), insect cells presented polyploidy and cell cycle arrest at the G2/M phase. This contrasts with mammalian cells that go into arrest at G1 phase. Polyploidy can result either from a population with a transitory tetraploid/diploid phase or from a mixed population of diploid and tetraploid cells. Léry et al. (1999) have recently shown that various insect cell lines present different content and distribution of DNA, Sf9 cells being the most homogeneous. Nonetheless, caution in generalizing such results must be taken.

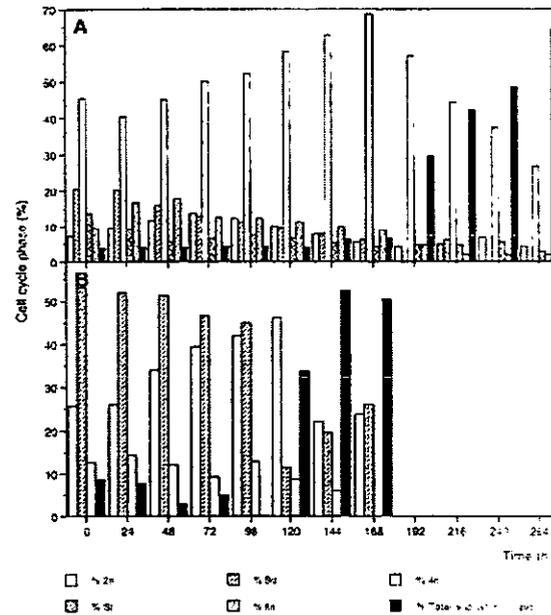


Figure 12. Kinetics of cell cycle distribution as determined by flow cytometry. A: Sf9 insect cells. B: Hybridoma cells. d, diploid population, t, tetraploid population, n, number of chromosomes.

Active phagocytosis, a characteristic PCD phenomenon of viable cells *in vivo*, has been previously described for various tissues in complete insects (Martau and Romer, 1998), but to our knowledge this is the first time such a

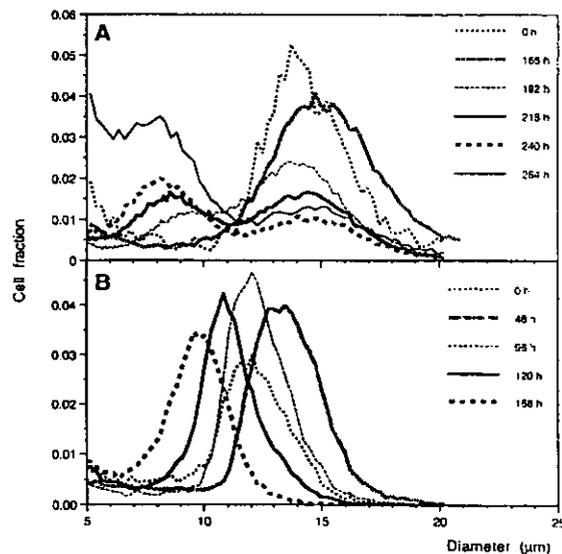


Figure 13. Cell size distribution profiles as a function of culture age. A: Sf9 insect cells. B: Hybridoma cells. Cell fraction corresponds to the particle count in the Coulter counter per channel divided by the total count between 5 and 20 µm.

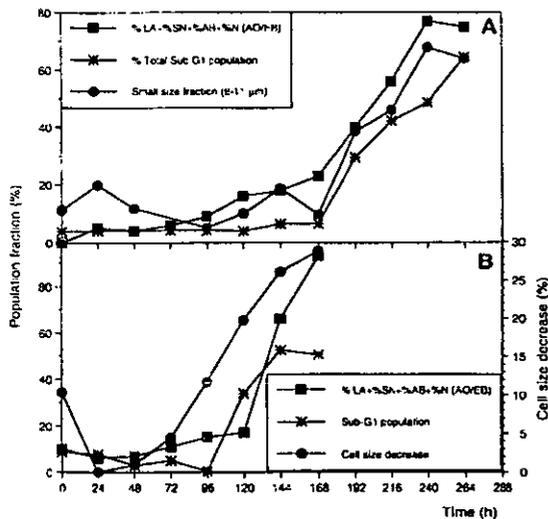


Figure 14. Comparison of fluorescent staining, flow cytometry, and cell size determinations for quantifying PCD. A: Sf9 insect cells. B: Hybridoma cells. Squares, LA, necrotic, and AB; asterisks, sub-G1 population; circles, fraction of particles between 6–11 μm (in A) or decrease in diameter with respect to maximum (in B).

phenomena has been observed for insect cells in vitro. This contrasts with the general notion that phagocytosis usually does not occur in cell culture since phagocytic cells are absent (Singh et al., 1997; Mastrangelo and Betenbaugh, 1998). Active phagocytosis could be responsible for some of the observed kinetic and morphological differences of PCD between hybridoma and Sf9 cell cultures. For instance, it could help contend with the limitation of a particular nutrient and explain why high viability was maintained for relatively long periods after glucose depletion, and why a late appearance and slower kinetics of PCD were detected in Sf9 cells compared to hybridomas. Autophagy has also been reported for both insects and mammals during PCD (Kitanaka and Kuchino, 1999; Xue et al., 1999). Thus, autophagy could also be responsible for some of the phagosomes observed in Sf9 cells during the late death phase.

A significant finding was the identification in Sf9 insect cell cultures of an atypical PCD, characterized by chromatin condensation scarcely associated to the nuclear envelope, mitochondria swelling, and a high nonspecific DNA degradation. In addition, no nuclear fragmentation occurred even in the most advanced phases of death. This contrasts with EM observations by Martau and Romer (1998), who detected nuclear fragmentation in complete insects. All atypical features observed are characteristics of necrotic-like death and were not detected during the normal apoptotic process of hybridomas. That is, in apoptotic hybridomas nuclear fragmentation was evident, mitochondria remained intact, and a high level of chromatin condensation appeared near the nuclear envelope. Nevertheless, some apoptotic-like characteristics were present in Sf9 cells, such as cell

shrinkage, loss of sphericity, swollen endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, presence of vacuoles, various levels of chromatin condensation, cell blebbing, and generation of apoptotic bodies. Such characteristics were also observed in hybridomas, which presented much more blebs surrounding nuclear bodies. Scarce information of the PCD molecular cascade exists for insect cells in vitro, although it has been best characterized in the insect *Drosophila melanogaster*, in which molecules of the executing machinery (e.g., caspases/ced-3, Apaf-1/ced-4) as well as some regulatory molecules (e.g., IAPs, bcl-2/ced-9) have recently been identified (Vernooij et al., 2000). A caspase homolog gene has also been identified in Sf9 cells (Ahmad et al., 1997). In this scenario, it is expected that enormous similarities will exist in the mechanisms controlling PCD in higher and lower multicellular organisms. Interestingly, necrotic-like death has been found in both higher and lower multicellular organisms with insensibility to caspase inhibitors (Chautan et al., 1999; Kitanaka and Kuchino, 1999). Nonetheless, much work is still needed to elucidate the molecular mechanisms responsible for the atypical features of PCD observed here for Sf9 cells. Once such information is generated, recombinant protein productivity by the insect cell baculovirus expression system could be enhanced by preventing PCD through similar metabolic engineering approaches used for mammalian cells (Mastrangelo and Betenbaugh, 1998; Fassnacht, et al., 1999).

Fluorescent microscopy data also revealed differences in the kinetics of PCD between both cell lines. Some differences in the staining patterns were related to differences in the amounts and extent of dispersion of heterochromatin and euchromatin between both cell lines. Glucose depletion marked the appearance of apoptotic-like Sf9 cells, which thereupon increased gradually, whereas in hybridomas a rapid increase in apoptosis occurred upon glutamine depletion. Therefore, the process of cell death observed in both cultures could represent the triggering of an endogenous cell death program in response to a critical decrease in essential metabolites. This information can also be used for nutrient feeding strategies aimed at preventing PCD and increasing recombinant protein productivity. Insect cells are commonly infected during the exponential phase; thus, the late appearance of apoptosis and the atypical characteristics found in Sf9 cells, could explain why it was not detected by Singh et al. (1994). The observed hybridoma features followed closely those previously described by Mercille and Massie (1994a), except that the progressive increase in granularity and successive stages of chromatin condensation were not detected, as was the case for Sf9 cells. Such a difference suggests a slower transition between EA-like and LA-like stages in Sf9 cells compared to hybridomas. Nonetheless, during late culture stages a rapid transition of LA-like to SN and later to cell debris occurred in Sf9 cells. Such an observation was also consistent with agarose gel electrophoresis and flow cytometry results. Furthermore, necrosis was more predominant in Sf9 cells compared to hybridomas. Cowger et al. (1999) also reported that necrotic death

was predominant over apoptosis for Sf9 cells in shake flasks; however, in their case necrosis was identified as primary. In addition, the relative absence of apoptotic bodies in insect cell cultures compared to hybridomas could be due to their rapid removal by the observed active phagocytic phenomenon. Cowger et al. (1999) observed a fourfold decrease in apoptotic bodies concentration when using a low turbulence bioreactor compared to shake flasks. Accordingly, the prevailing hydrodynamic conditions could also be rupturing AB, but this was not investigated. In both cell lines, the sum of EA and viable cells determined by AO/EB corresponded to the viable cells determined by Trypan blue exclusion, indicating that EA cells retain their plasma membrane integrity. This should be a caution on the use of Trypan blue as the sole indicator of cell culture state (Al-Rubeai et al., 1991). In addition, cell death classification by dye staining is prone to the interpretation of the observer, emphasizing the importance of more categorical determinations such as EM.

Agarose gel electrophoresis determinations of Sf9 cells presented a mixed pattern of DNA degradation, whereas for hybridomas a sharper DNA ladder pattern was obtained. Two types of necrotic cell death, primary (resulting from passive damage) and secondary (occurring at the latest stage of apoptosis) have been inferred by Cowger et al. (1997) in insect cells from the DNA smears obtained in agarose gel electrophoresis. Nonspecific DNA degradation was corroborated by the presence of a sub-G1 population rather than a sharply defined sub-G1 peak. The clearly defined sub-G1 peak obtained in hybridomas also indicated a more specific DNA degradation than in Sf9 cells. Such a behavior, in addition to inadequacies of general protocols for DNA agarose gel electrophoresis, could explain why some groups have not identified PCD in Sf9 cells. The presence of polyploidy and arrest in G2/M phase (4n) can make the identification of the sub-G1 peak difficult due to two possibilities. Considering that a single population exists with different DNA content, the increase in the 4n peak indicates a cell cycle arrest at the G2/M diploid phase. In such a case the sub-G1 peak would be masked by cells in Sd and even by cells in the 2n peak corresponding to cells in G1/G0 of diploid phase. Alternatively, for the possibility of two distinct mixed populations, the 4n peak would correspond to an overlap of cells in G2/M diploid phase and G1/G0 of tetraploid phase. PCD of the tetraploid population would then be masked by the viable diploid population. Altogether, these results show the difficulty of quantifying PCD in insect cell culture by DNA analysis content, which may be aggravated by the rapid transition of LA-like to SN or direct transition of EA-like to SN. Caution should also be taken when analyzing the sub-G1 population, since it can also be comprised of necrotic cells. Still, determination of the sub-G1 population can yield information, at least partially, of the death process by quantifying the population fraction with an inferior DNA content than the 2n population. Although a sharp sub-G1 peak could be quantified for hybridomas, results showed that PCD was also untimely and

erroneously underestimated by this method. Limitations for determining PCD by flow cytometry have been discussed by Al-Rubeai (1998) and Moran et al. (1999).

Finally, the limitations of commonly employed techniques for determining apoptosis prompted us to explore the utility of cell size for inferring PCD. Sf9 cells initially presented a unimodal size distribution profile with a constant mean cell diameter and a relatively broad standard deviation. This latter characteristic is consistent with the hypertrophic population, polyploidy, and active phagocytosis phenomena reported here. Towards the end of stationary phase a smaller second peak emerged which closely correlated with AB, LA, and necrotic (mainly SN) cells. Ohyama et al. (1981) also observed the emergence of a second population with a reduced cell size and correlated it with cell mortality, although no reference to PCD was made. In contrast to insect cells, hybridomas always presented a unimodal distribution with a relatively narrow standard deviation (indicative of a homogenous population) and a constantly decreasing mean cell diameter after the end of the exponential growth phase. This could be the consequence of an increase in the arrested population at the G1/G0 phases, which is in agreement with previous reports (Ramírez and Muthrasan, 1990). The decrease in hybridoma diameter preceded in a nonlinear way the increase in AB, LA, and necrotic cells. Moran et al. (1999) recently indicated that cell shrinkage and fragmentation during apoptosis of myeloma cells correlated with cell size distribution, but no further quantitative evidence was provided. Altogether, our results indicate that cell size can be used as an effective, rapid, and simple means for quantifying PCD in Sf9 cell cultures, but more work is still necessary before extending such a conclusion to other cell lines. It should be noted that cell size determinations must be used with prudence since certain culture conditions, such as large osmolarity variations and infection, can also substantially affect them.

CONCLUSION

The aim of this work was to comprehensively characterize cell death in Sf9 cell culture since very scarce information is available for this important cell line. Commonly employed methods for determining PCD suffer various limitations. In particular, they strongly depend on the interpretation of the operator and only reveal partial features of apoptosis, leading to determination errors. To overcome such limitations, cell death in Sf9 cells was simultaneously characterized with a number of qualitative and quantitative techniques, and results were compared to hybridomas where abundant information about apoptosis exists. Such an approach revealed distinctive morphological and kinetic differences of PCD between both cultures. Such differences showed that Sf9 cells died by an atypical PCD process characterized by some necrotic features simultaneously present with some apoptotic characteristics. In addition, active phagocytosis, a highly uncommon phenomenon during *in vitro* culture, was identified in this cell line. The presence of

such an event explained the low percentage of apoptotic bodies in culture and slower kinetics of death compared to hybridoma cultures. In contrast to hybridomas, where the sub-G1 peak was clearly quantified, PCD was poorly quantified in Sf9 cells by flow cytometry due to the presence of a polynucleated population, polyploidy, and G2/M arrest. Finally, it was shown that the emergence of a characteristic bimodal size distribution coincided with the increase in the sub-G1 population and onset of death in Sf9 cells. The fraction of particles in the smaller peak closely correlated with the fractions of apoptotic bodies, late apoptotic, and secondary necrotic cells. Accordingly, cell size was shown to be an effective, rapid, and simple parameter for quantifying death.

We thank Dr. L. A. Palomares for helpful discussions on cell culture, Drs. J.A. Reyes, G. Pedraza, and Y. Rosenstein for help in flow cytometry, X. Alvarado and J.G. Baltazar for assistance on microscopy, and A. Gómez for technical support.

NOMENCLATURE

AB	apoptotic body
AO	acridine orange
CM	confocal microscopy
EA	early apoptotic
EB	ethidium bromide
EFM	epifluorescence microscopy
EM	electron microscopy
LA	late apoptotic
N	primary necrotic
nf	nuclear fragmentation
nl	nucleolus
PCD	physiological cell death
Sd	diploid DNA synthesis phase
SN	secondary necrotic
St	tetraploid DNA synthesis phase

References

- Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 1997. Spodoptera frugiperda caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35. *J Biol Chem* 272: 1421-1424.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. *Molecular biology of the cell*, 3rd ed. New York: Y. Garland. p 958-966.
- Al-Rubeai M. 1998. Apoptosis and cell culture technology. *Adv Biochem Eng/Biotech* 59:225-249.
- Al-Rubeai M, Mills M, Emery AN. 1990. Electron microscopy of hybridoma cells with special regard to monoclonal antibody production. *Cytotechnology* 4:13-28.
- Al-Rubeai M, Emery AN, Chalder S. 1991. Flow cytometric study of cultured mammalian cells. *J Biotechnol* 19:67-82.
- Al-Rubeai M, Singh RP, Goldman MH, Emery AN. 1995a. Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol Bioeng* 45:463-472.
- Al-Rubeai M, Singh RP, Emery AN, Zhang Z. 1995b. Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces. *Biotechnol Bioeng* 46:88-92.
- Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P. 1999. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 9:967-970.
- Clem RJ, Fechheimer M, Miller LK. 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254: 1388-1390.
- Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. 1992. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 286:331-334.
- Collins RJ, Harmon BV, Gobé GC, Kerr JFR. 1992. Internucleosomal DNA cleavage should not be used as the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 61:451-453.
- Cowger NL, O'Connor KC, Bivins JE. 1997. Influence of simulated microgravity on the longevity of insect-cell culture. *Enzyme Microb Technol* 20:326-332.
- Cowger NL, O'Connor KC, Hammond TG, Lacks DJ, Navar GL. 1999. Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating-wall vessel and shaker flask. *Biotechnol Bioeng* 64:14-26.
- Cross PC, Mercer KL. 1993. *Cell and tissue ultrastructure, a functional perspective*. New York: Freeman and Company. p 2-42.
- Duke RC, Cohen JJ. 1995. Morphological, biochemical and flow cytometric assays of apoptosis. In: Janssen K, editor. *Current protocols in immunology*. New York: John Wiley & Sons. p. 3.17.1-33.
- Duncan R, Muller J, Lee N, Esmaili A, Nakhasi HL. 1999. Rubella virus-induced apoptosis varies among cell lines and is modulated by Bcl-X_L and caspase inhibitors. *Virology* 255:117-128.
- Fassnacht D, Rössing S, Ghaussy N, Pörtner R. 1997. Influence of non-essential amino acids on apoptotic and necrotic death of mouse hybridoma cells in batch cultures. *Biotech Lett* 19:35-38.
- Fassnacht D, Rössing S, Singh RP, Al-Rubeai M, Pörtner R. 1999. Influence of bcl-2 on antibody productivity in high cell density perfusion cultures of hybridoma. *Cytotechnology* 30:95-105.
- Fertig G, Klöppinger M, Miltenburger HG. 1990. Cell cycle kinetics of insect cell cultures compared to mammalian cell cultures. *Exp Cell Res* 189:208-212.
- Franěk F, Vomastek T, Dolníková J. 1992. Fragmented DNA and apoptotic bodies document the programmed way of cell death in hybridoma cultures. *Cytotechnology* 9:117-123.
- Goswami J, Sinskey AJ, Steller H, Stephanopoulos GN, Wang DIC. 1999. Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 62:632-640.
- Higareda AE, Possani LD, Ramírez OT. 1997. The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng* 56:555-563.
- Kitanaka C, Kuchino Y. 1999. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 6:508-515.
- Léry X, Charpentier G, Belloncik S. 1999. DNA content analysis of insect cell lines by flow cytometry. *Cytotechnology* 29:103-113.
- Martau T, Romer F. 1998. Degeneration of moulting glands in males crickets. *J Insect Physiol* 44:981-989.
- Mastrangelo AJ, Betenbaugh MJ. 1998. Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *Trends Biotechnol* 16: 88-95.
- Mastrangelo AJ, Zou S, Hardwick JM, Betenbaugh MJ. 1999. Antiapoptosis chemicals prolong productive lifetimes of mammalian cells upon Sindbis virus vector infection. *Biotechnol Bioeng* 65:298-305.
- Mendonça RZ, Palomares LA, Ramírez OT. 1998. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *J Biotechnol* 72:61-75.
- Mercille S, Massie B. 1994a. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol Bioeng* 44: 1140-1154.
- Mercille S, Massie B. 1994b. Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells. *Cytotechnology* 15:117-128.
- Moran E, McGowan S, Reynolds N, Wilson C. 1999. Effect of bioreactor process control parameters on apoptosis and monoclonal antibody production during the protein-free fed-batch culture of a murine myeloma. In: Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F, editors. *Animal cell technology: products from cells, cells as products*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p 51-53.
- Nagarathnamma, Rajan MM, Sureshkumar GK. 1997. Apoptosis extent

- increases in hybridoma cultures with temperature. *Biotechnol Lett* 19: 669-673.
- Ohyama H, Yamada T, Watanabe I. 1981. Cell volume reduction associated with interphase death in rat thymocytes. *Radiat Res* 85:333-339.
- Prikhod'Ko GG, Wang Y, Freulich E, Prives C, Miller LK. 1999. Baculovirus p33 binds human p53 and enhances p53-mediated apoptosis. *J Virol* 73:1227-1234.
- Ramírez OT, 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.
- Sanfeliu A, Stephanopoulos G. 1999. Effect of glutamine limitation on the death of attached Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 64:46-53.
- Schopf B, Howaldt MW, Bailey JE. 1990. DNA distribution and respiratory activity of *Spodoptera frugiperda* populations infected with wild-type and recombinant *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Biotechnol* 15:169-186.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA. 1993. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14:133-151.
- Simpson NH, Singh RP, Perani A, Goldenzon C, Al-Rubeai M. 1998. In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of the *bcl-2* gene. *Biotechnol Bioeng* 59:90-98.
- Singh RP, Al-Rubeai M. 1999. Apoptosis. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. *Encyclopedia of bioprocess technology. Fermentation, biocatalysis, and bioseparation*, vol. I. New York: Wiley-Interscience. p 191-201.
- Singh RP, Al-Rubeai M, Gregory CD, Emery AN. 1994. Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. *Biotechnol Bioeng* 44:720-726.
- Singh RP, Finka G, Emery AN, Al-Rubeai M. 1997. Apoptosis and its control in cell culture systems. *Cytotechnology* 23:87-93.
- Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JTT. 1989. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 337:181-183.
- Vernooij SY, Copeland J, Ghaboosi N, Griffin EE, Yoo SJ, Hay BA. 2000. Cell death regulation in *Drosophila*: conservation of mechanism and unique insights. *J Cell Biol* 150:F69-76.
- Westlund A, Håggström L. 1998. Ammonium ion transport by the Na⁺K⁺2Cl⁻-cotransporter induces apoptosis in hybridoma cells. *Biotechnol Lett* 20:87-90.
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. 1999. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 14:180-98.
- Zanghi JA, Fussenegger M, Bailey JE. 1999. Serum protects protein-free competent Chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture. *Biotechnol Bioeng* 64:108-119.

V.1.3. Caracterización de hibridomas murinos que sobreexpresan el gene antiapoptótico *bcl-2*

Se realizó una estancia en la Universidad de Birmingham con el Dr. Mohamed Al-Rubeai, con el objetivo de evaluar el tipo de muerte en hibridomas murinos TB/C3 transfectados con el gene antiapoptótico *bcl-2*, el cual se cree está involucrado en rutas antioxidantes (y por tanto, involucrada en el potencial redox intracelular) de la célula (Hockenbery *et al.*, 1993; Buttke y Sandstorm, 1994; Singh *et al.*, 1996; Al-Rubeai *et al.*, 1997, Mastrangelo *et al.*, 2000 a y b). La muerte celular se evaluó por tinción con colorantes fluorescentes, por ciclo celular con citometría de flujo (descritos en Materiales y Métodos) y por la incorporación de Anexina V-FITC a la membrana plasmática. Esta última técnica se basa en que la anexina V-FITC reconoce la fosfatidil-serina, un fosfolípido de la membrana plasmática que pasa al lado exterior de dicha membrana cuando se desencadena el proceso apoptótico; la medición de esta incorporación se realizó por medio de citometría de flujo.

Los resultados cinéticos para hibridomas se muestran en la Figura V.2. La línea transfectada con el gene antiapoptótico *bcl-2* presentó mayor concentración celular y la viabilidad del cultivo permaneció en un alto valor (60%) después de 152 h de cultivo, en comparación al cultivo que no sobreexpresaba *bcl-2* (control) en el cual la viabilidad disminuyó drásticamente después de las 96 h. Es necesario hacer notar que las células control también contenían el plásmido base con el que se insertó *bcl-2*, pero no contenían dicho gene. En la Figura V.3. se muestran las cinéticas de muerte de ambos cultivos. En este caso, la identificación de la muerte celular fue por epifluorescencia con AO/BE. Como se aprecia en la Figura V.3a, los hibridomas control, presentaron el patrón típico de apoptosis desde las 48 h de cultivo, identificándose la morfología de las células apoptóticas tempranas. También se observa que la población de células apoptóticas tardías se incrementó drásticamente al final del cultivo; la población de células necróticas nunca excedió el 15% del total. En contraste, en el caso de la línea con *bcl-2* (Figura V.3b), se observó que la población de células muertas después de 152 h de cultivo era en mayor porcentaje necrótica, pero también se observaron células apoptóticas tempranas y tardías. Por medio del análisis del ciclo celular (datos no mostrados), se observó que en la línea celular control, la aparición del llamado pico "sub-G1" se hizo evidente a las 72 h de cultivo y fue progresando hasta ser la población predominante a las 120 h, concordando con un aumento en la población de células de menor tamaño y con mayor rugosidad en la membrana plasmática. Por el contrario, en el caso de la línea con *Bcl-2*, la aparición de una población más inespecífica del lado izquierdo de G1/G0 se hizo evidente hasta las 152 h de cultivo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Al-Rubeai *et al.* (1996 y 1997) y Fassnacht *et al.* (1998), quienes observaron que *Bcl-2* incrementó la concentración celular y la viabilidad de los cultivos or un mayor período de tiempo. Ambos sugieren que la inducción de este

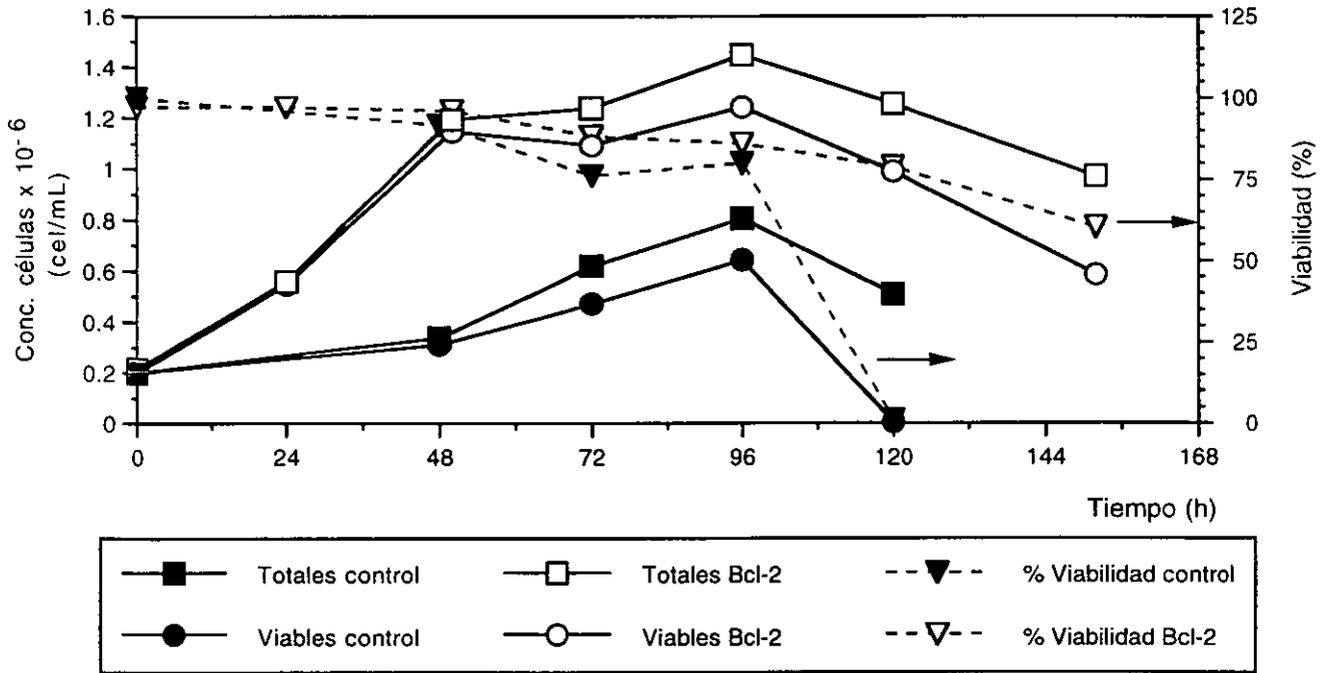


Figura V.2.- Cinética de un cultivo por lote de hibridomas transfectados con el gene antiapoptótico *bcl-2*.

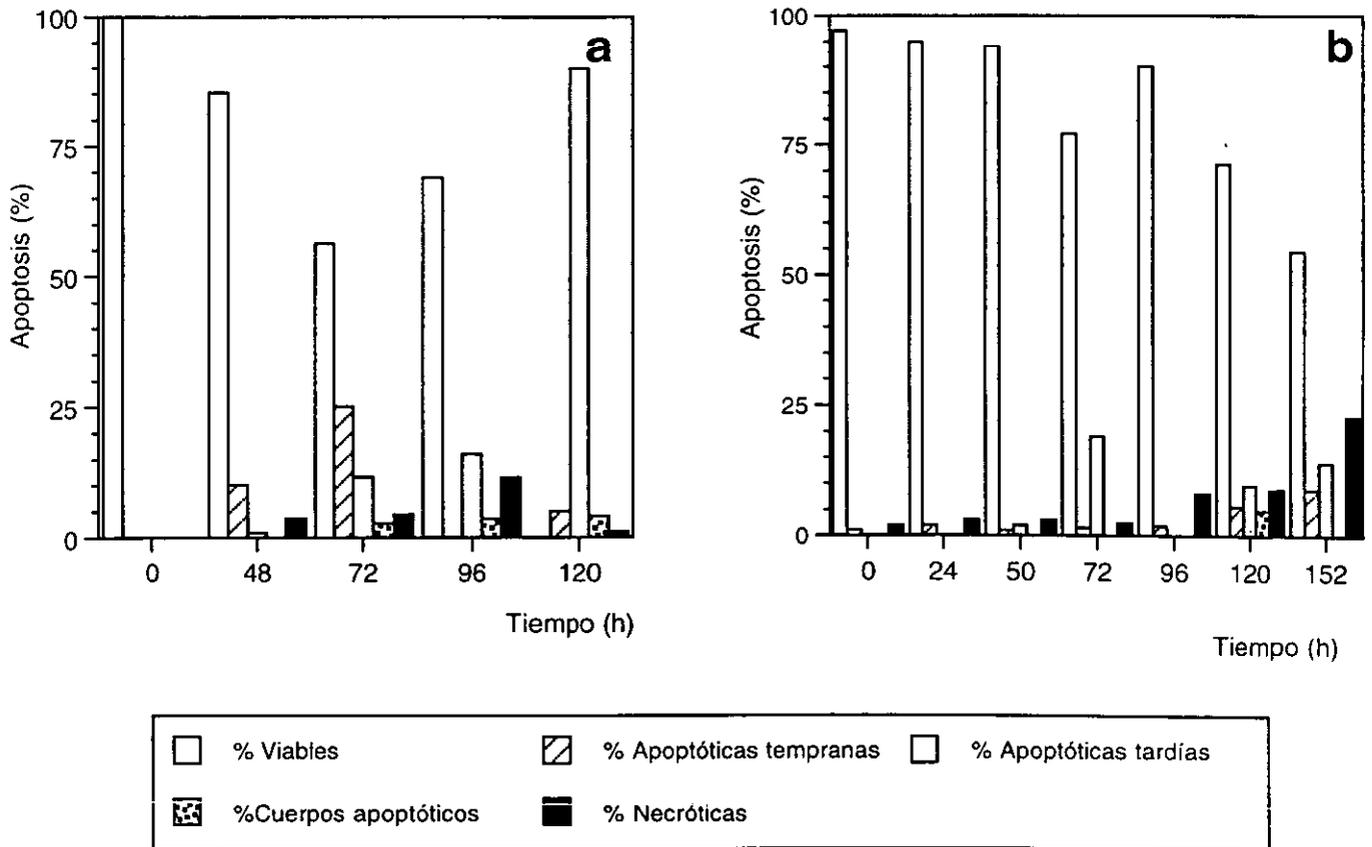


Figura V.3.- Cinética de muerte en los hibridomas. a) Control. b) Transfectado con *bcl-2*.

tipo de muerte puede llevarse a cabo por una cascada de señalización independiente de aquella que involucra a Bcl-2. Reportes recientes han mostrado que esta proteína no es capaz de inhibir totalmente la muerte apoptótica, causando solamente un retardo en la aparición de ésta (Mastrangelo *et al.*, 2000 a y b). Sin embargo, la ventaja de obtener una mayor concentración de células viables y de poder mantener una alta viabilidad en el cultivo en un mayor periodo de tiempo ocasiona que la productividad y la producción final de AcMo sean más altas que en los cultivos control.

El uso de nuevas alternativas, tanto genéticas como de control (en este caso el PRC) para inhibir la muerte celular programada puede permitir incrementar las productividades en los cultivos. En nuestro caso, fue importante explorar la alternativa genética, ya que si la proteína antiapoptótica Bcl-2 está involucrada en alguna vía de oxido-reducción intracelular, quizá sea posible incrementar las productividades en cultivos de hibridomas modificando además el potencial de oxido-reducción extracelular ya que éste puede repercutir de manera directa en el potencial redox intracelular. Asimismo, es posible diseñar nuevas estrategias de control utilizando líneas sobreproductoras con genes antiapoptóticos para optimizar la producción de anticuerpos monoclonales en el área de cultivo de células animales.

V.1.4. Determinación de la presencia de retrovirus endógeno en la línea de hibridomas BCF2

Al realizar la microscopía electrónica de los hibridomas BCF2 se observó que esta línea contenía un virus endógeno. Con base en la literatura y en las características morfológicas observadas se determinó que este virus es un retrovirus que se halla tanto en el citoplasma (Figuras V.4a y V.4b) como en el retículo endoplásmico (Figura V.4c) correspondiendo morfológicamente a dos tipos de partículas denominadas tipo-A y tipo-C (Weiss, 1982). Estas partículas son producidas frecuente y abundantemente por los hibridomas y pueden acumularse en un gran número de copias en el genoma del ratón por lo que son heredadas como genomas virales endógenos. En general, éstos provienen del plasmacitoma y/o del mieloma precursor de los hibridomas, siendo ejemplo común el ratón Balb/C. En el caso del hibridoma BCF2, el linaje del linfocito B y del mieloma provienen de esta línea de ratones (Zamudio *et al.*, 1992) por lo que no es extraño encontrar tales partículas. Considerando que se trata de un virus endógeno que ha estado presente desde que la línea BCF2 se desarrolló y siendo este virus un producto intrínseco de la célula, se consideró que dicha presencia no tiene influencia sobre los valores obtenidos en los experimentos ya que todos estos fueron realizados con la misma línea, la cual ha sido ampliamente caracterizada en el laboratorio. En este caso, no se hizo una determinación más profunda del tipo de partícula, por lo que solamente se consideraron sus características morfológicas pudiendo clasificarlas en el tipo A o C.

Las partículas tipo-A (Kuff y Lueders. 1988) son no-infectivas e incompletas y son el producto de un alto número de copias de un provirus endógeno conocido como el elemento IAP (partícula intracisternal A) (413,698) (Coffin, 1996). Esta estructura se observa generalmente dentro de membranas intracelulares, las cuales nunca salen del organelo, por lo que en este caso pueden corresponder a las estructuras observadas en la Figura V.4c. Sin embargo, aunque en las morfologías observadas no se observa que salgan del RE, la observación debe de tomarse con precaución.

Las partículas tipo C se consideran los virus de mamífero más simples. Generalmente no se observan como estructuras intracelulares completas (Figuras V.4a y V.4b) (en este caso se hallan en el citoplasma) ya que la salida de la célula y el ensamble del virus parecen ocurrir simultáneamente (Figura V.4d) (Lyon y Huppert, 1983). Estas partículas tienen la capacidad de salir de la célula tomando fragmentos de la membrana citoplasmática (Figuras V.4d y V.4e), característica que puede permitir la rápida infección de otras células, dándose dicho proceso quizá por invaginaciones (Figura V.4f) y fusión de ambas membranas; proceso muy común en la infección viral. Las partículas C pueden clasificarse de acuerdo a dos tipos de hospederos: aquellos que infectan y se replican sólo en células de ratón (ectópicos) o aquellos que se replican en células de otras especies (xenotópicos) (Coffin, 1996). En este caso no se realizó la identificación del virus con base al hospedero por lo que no es posible concluir si dicho virus pudiera infectar células humanas, aún cuando se ha reportado que éste no es patógeno aunque es de los más comunes (Weiss, 1982).

Se ha reportado que el 85% de las líneas productoras de AcMo están contaminadas con virus o partículas tipo A y/o C (Weiss, 1982; Lyon y Huppert, 1983; Mariani y Tarditi, 1992). De ahí, que sea necesario establecer nuevas normas de control de calidad y de regulación para el uso de anticuerpos monoclonales en el área terapéutica. Numerosos métodos basados en la identificación de la transcriptasa inversa de los retrovirus se han desarrollado para la identificación y cuantificación de este tipo de presencia viral (Lyon y Huppert, 1983; Kuno *et al.*, 1999). También se está realizando la validación de nuevas estrategias de preparación de anticuerpos monoclonales (Mariani y Tarditi, 1992) para evitar que se presenten en el producto final para uso humano. En este caso queda como perspectiva la identificación más detallada del tipo de partícula para conocer si es una partícula A o C.

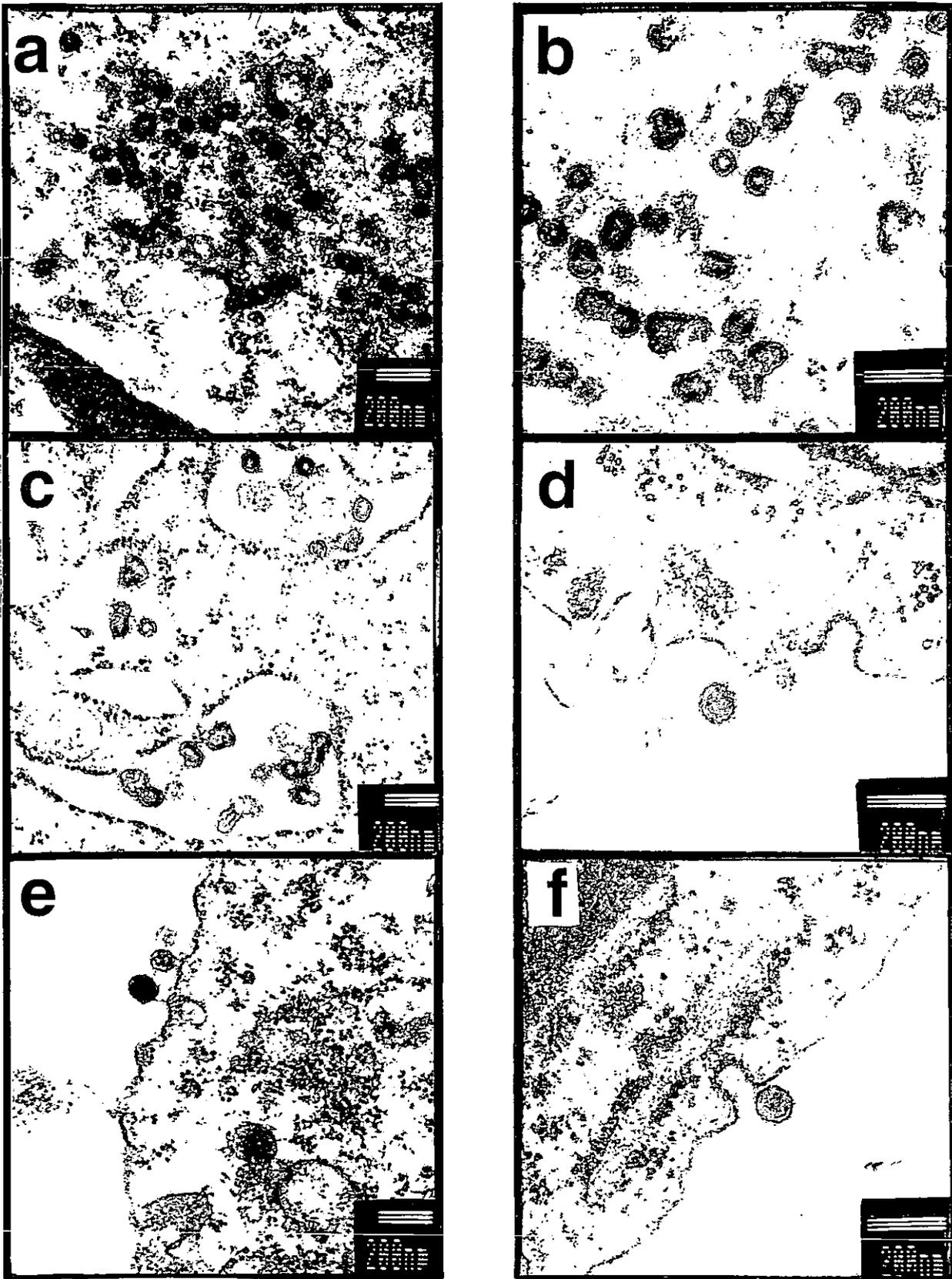


Figura V.4.- Presencia de virus endógeno en las células de hibridomas BCF2. a) En el citoplasma. b) Partículas no ensambladas en el citoplasma. c) En el retículo endoplásmico. d) Salida de una partícula tipo C. e) Virus con fragmentos de membrana celular. f) Infección viral por invaginación.

V.2. Manipulación del potencial redox del cultivo (PRC)

V.2.1. *Diseño del sistema de control del potencial redox de cultivo en biorreactores de 1L*

V.2.1.1. Sistema de control y adquisición de datos para el control del potencial redox de cultivo en biorreactores de 1L.

Se llevó a cabo la modificación del programa de control desarrollado por Aguilar-Aguila *et al.* (1993) para control de OD y pH. Este es un programa de control de tipo proporcional escrito en Microsoft QuickBasic al que se le agregó una subrutina extra que permite controlar el PRC mediante la variación de la composición del flujo de los gases de entrada, siendo éstos: oxígeno, nitrógeno y bióxido de carbono. Esta modificación se realizó considerando que el cambio en la composición de los flujos de entrada afecta directamente el OD y el pH, y estos son parámetros relacionados de forma directa con el potencial redox por medio de la ecuación de Nernst (descrita en antecedentes). El listado del programa se encuentra en el apéndice B. A este programa también se le agregaron subrutinas de entrada para hacerlo más didáctico. Estas subrutinas permiten introducir diferentes opciones de control como son: 1) el control del OD y del pH; 2) el control del pH y del PRC y; 3) el control del OD y del PRC. Otra modificación fue la introducción de tiempos de control independientes para cada uno de los parámetros, de tal forma que, por ejemplo, el tiempo para ejercer el control sobre OD puede hacerse de 800 seg. mientras que para pH puede ser de 1200 seg. Esto permitió un mayor control sobre cada uno de los parámetros de cultivo en las dos alternativas utilizadas para este proyecto: por un lado el control del OD y pH y, por otro, el control del PRC y del pH. Por último, se preestablecieron valores de entrada para la composición de gases y para la corrección de la presión atmosférica. Los valores iniciales fueron: $O_2=19.74\%$, $N_2 = 74.26\%$ y $CO_2 = 6\%$ (los cuales corresponden a un control de OD del 100% en medio sin células) a los cuales se les colocó un seguro para prevenir que la suma de estos fuera mayor al 100%. El valor de corrección de presión a la altitud de Cuernavaca también se fijó en $\text{Alfa} = 1.225$.

V.2.1.2. Constantes de control para un sistema de comportamiento logarítmico.

Se calcularon las ganancias de control utilizando los métodos semi-empíricos de la curva de reacción de Ziegler y Nichols y, Cohen y Coon (Sthephanopoulous, 1984) en un sistema libre de células a diferentes intervalos de OD. En este caso la variable de entrada fue el OD y la de salida el PRC. Se observó que en este sistema dicha ganancia varió de 0.06 a 0.1 en un intervalo de 0 a 50% OD, hasta un valor de 0.7 a 0.9 para OD de 100 a 200%. Así también, los valores reportados para un cultivo con células se reportan en el artículo "*Feedback control of redox potential in hybridoma cell culture*" (Meneses *et al.*, 1999) presentado en la sección V.2.3. La variación en las ganancias obtenidas se explica por el comportamiento logarítmico del sistema representado por la ecuación de Nernst (ver Antecedentes). Es decir, la relación que existe entre el OD y PRC permite

que a valores reductores, un cambio pequeño en el OD sea suficiente para ocasionar un cambio en el PRC. Sin embargo, para valores oxidantes es necesario utilizar valores muy grandes de ganancia ya que se requieren cambios muy drásticos en el OD para producir pequeños cambios en el PRC. En la Figura V.5 se muestran las variaciones en el OD que tuvieron que realizarse para lograr el control del PRC. Como se observa, en el control a valores muy reductores, el intervalo de variación del OD fue pequeño, mientras que para valores oxidantes la variación en el OD fue superior al 100% en todos los casos. Estos resultados llevaron a desarrollar un control proporcional que permitiera manipular una variable con comportamiento logarítmico, siendo para nuestro conocimiento, la primera vez que se reporta un control de este tipo a nivel mundial. Ejemplos del comportamiento típico del control desarrollado se muestran en la Figura V.6 y en la Figura 1 del artículo "Feedback control of redox potential in hybridoma cell culture" (Meneses *et al.*, 1999). En el primer caso, se muestra el control a un valor muy oxidante como es +90 mV (el valor más oxidante probado en los experimentos realizados), en el cual se utilizó una tolerancia de +/- 5 mV. El control del PRC se mantuvo por 288 h de cultivo utilizando una ganancia o constante proporcional del sistema de 1.00 en la fase exponencial del cultivo. En el segundo caso, se mantuvo el control en un valor muy reductor (-133 mV) con una tolerancia de +/- 10 mV. La ganancia utilizada fue de 0.03 en la etapa exponencial del cultivo.

Los valores de las ganancias halladas permitieron obtener un control del PRC tanto preciso como exacto. En la Figura V.7 se muestran dichos valores. En este caso, se representa el valor establecido (PRC_{sp}) en el eje X contra el valor medido (PRC_m) en el eje Y. Las barras de error en ninguno de los casos fueron mayores al 10% del valor preestablecido.

V.2.1.3. Cinéticas en biorreactor libre de células.

Considerando que el incremento en el PRC que sufren los cultivos con control de OD durante la fase estacionaria (datos mostrados posteriormente) podría ser consecuencia de la degradación espontánea de nutrientes causada por la temperatura de 37°C y por el OD en el medio de cultivo, se determinó el PRC por 5 días a 37°C y 100% OD en un sistema libre de células a pH 7.2. Se observó que el PRC solamente tuvo una variación de 6 mV en este período de tiempo por lo que concluimos que la influencia sobre el PRC por parte de la oxidación del medio del cultivo puede despreciarse. También se evaluó la descomposición de nutrientes bajo estas condiciones, encontrándose que la velocidad de descomposición de la glutamina fue de 7.3 µmoles de gln/h. Este valor está relacionado con la velocidad de producción de amonio (11 µmoles de amonio/h) considerando una reacción estequiométrica de 2 moles de amonio por mol de glutamina. Las concentraciones de glutamato y de glucosa permanecieron constantes. La velocidad de descomposición de tioles fue de 0.05 µmoles de SH/h. Estos valores son importantes para no

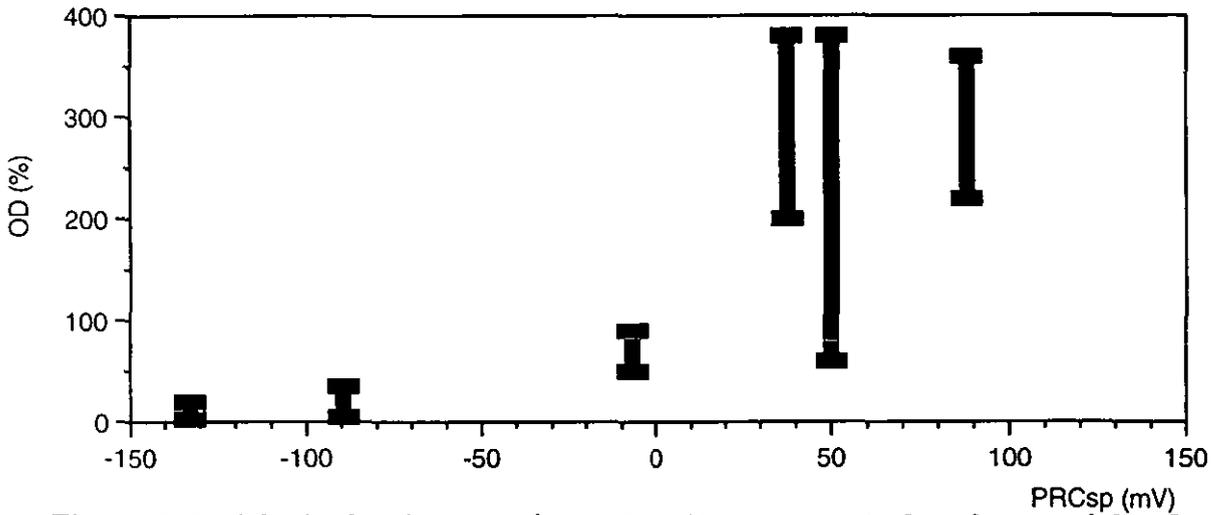


Figura V.5.- Manipulación del oxígeno disuelto para controlar el potencial redox del cultivo. PRCsp es el PRC deseado (o fijado como valor preestablecido).

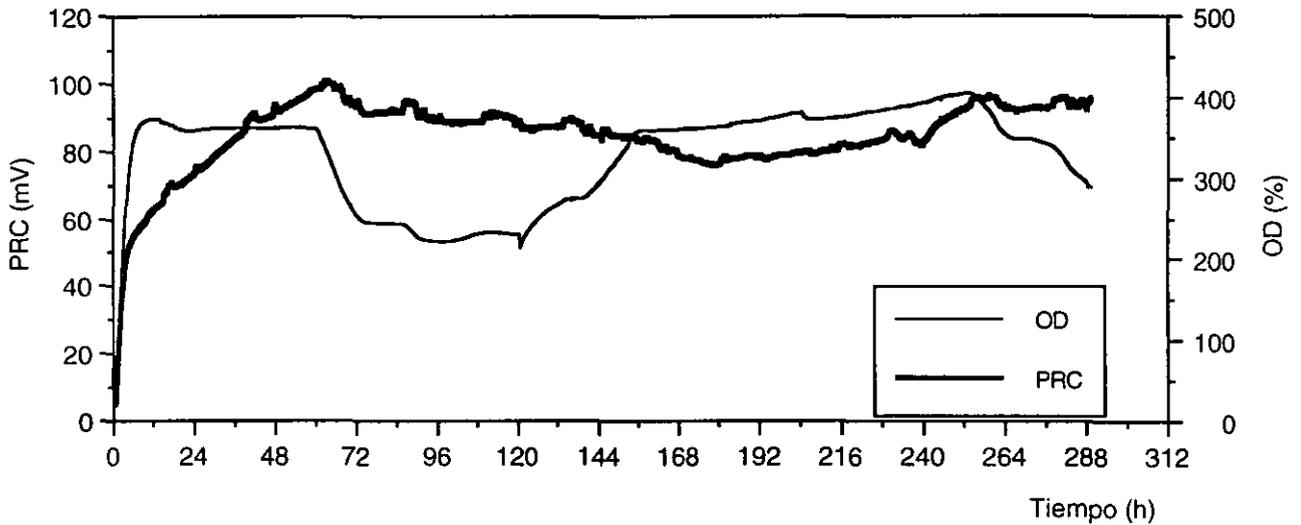


Figura V.6.- Control del potencial redox del cultivo a + 90 mV por manipulación del OD. La tolerancia fue de +/- 10 mV.

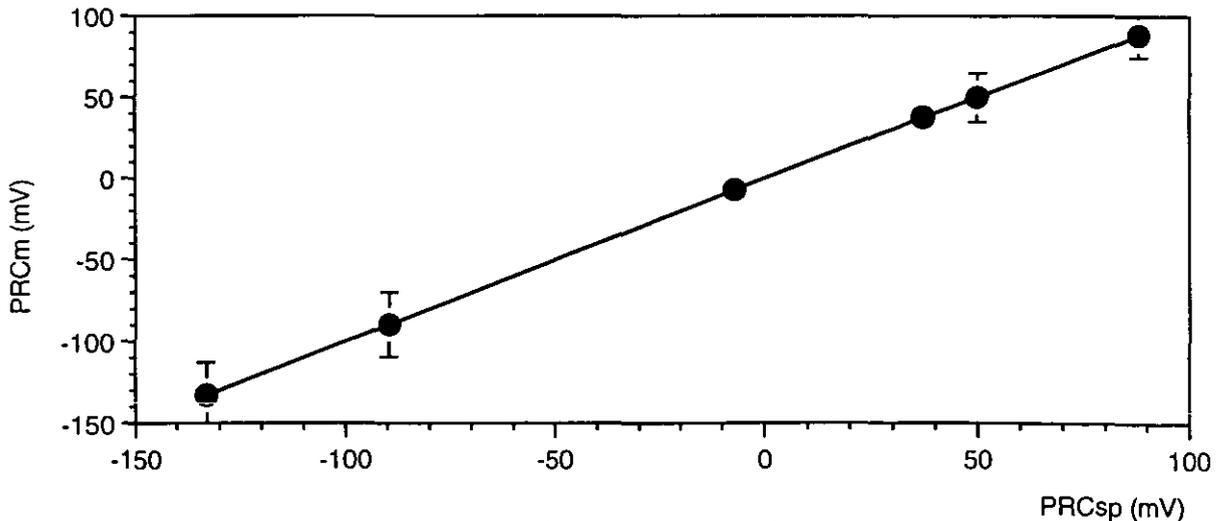


Figura V.7.- Exactitud y precisión del control del potencial redox de cultivo desarrollado. CRPsp es el CRP deseado (o fijado como valor preestablecido).mientras que CRPm es el PRC medido.

sobrevalorar el consumo de nutrimentos o la producción de metabolitos tóxicos por parte de las células. Estos valores se restaron a cada una de las cinéticas realizadas.

Por otra parte, se evaluaron las mediciones del PRC a 50% de OD y pH 7.2 utilizando diferentes electrodos. Esto se realizó con la finalidad de estandarizar las lecturas dadas por éstos últimos y poder comparar los resultados obtenidos en cada cultivo. Se observó que la ordenada al origen es dependiente del electrodo; es decir, el valor inicial del PRC medido por diferentes electrodos a las mismas condiciones de OD, temperatura, pH y agitación es diferente entre electrodos y constante para cada electrodo. Sin embargo, la pendiente obtenida cuando se realizan cambios en el OD o en el pH es igual para todos los electrodos. Al obtener una respuesta igual en los electrodos las lecturas se pudieron estandarizar. Tal estandarización consistió en iniciar todos los cultivos (con control del PRC ó del OD) a las condiciones de 37°C, 50% OD y pH 7.2 en el medio de cultivo y ajustar la lectura registrada del PRC a cero mV en estas condiciones. Esta consideración permitió registrar los cambios del PRC como variaciones constantes dado que las pendientes fueron iguales. De esta manera, cultivos con PRC más positivos que el PRC inicial fueron cultivos oxidantes y aquellos cultivos negativos con respecto al PRC inicial, fueron reductores. Esta dependencia de la ordenada con respecto al electrodo fue inicialmente reportada por Hwang y Sinskey (1991) quienes consideraron que al ser el potencial de oxido-reducción una medida del intercambio de electrones entre la membrana del electrodo y el medio de cultivo, las características de los anillos de platino en cada electrodo pueden variar y pueden dar lecturas diferentes; sin embargo, las pendientes obtenidas por los electrodos utilizados fueron también las mismas. Al realizar la estandarización de la lectura del PRC se elimina la influencia de la ordenada y es posible establecer las comparaciones a diferentes PRC.

V.2.2. Comportamiento del PRC y correlación con el número de células viables a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto.

Dentro de las pocas aplicaciones del monitoreo en línea del PRC en el área de cultivo de células animales se encuentra la determinación de la concentración de células viables en cultivos por lote. La relación entre el PRC y las células viables ha sido reportada previamente por Hwang y Sinskey (1991) y más recientemente por Eyer y Heinzle (1996). Ellos establecieron las correlaciones con células viables a diferentes valores de oxígeno disuelto. Para incrementar el conocimiento con respecto al comportamiento del PRC, se establecieron cultivos a diferentes concentraciones de OD en los que se monitoreó el PRC y la concentración de células viables para encontrar las correlaciones respectivas. Los resultados se muestran en la Figura V.8. A 3% de OD (Figura V.8a), un cambio muy drástico en el PRC con respecto al valor inicial (-220 mV) se presentó durante la

fase exponencial del cultivo. Sin embargo, al inicio de la fase de muerte, cuando se presentó el agotamiento de glutamina (120 h), no se observó el incremento en el PRC, anteriormente reportado por Hwang y Sinskey (1991). Este fenómeno puede ser explicado considerando que la condición oxidante del medio era mínima y por tanto, los compuestos reductores generados por las células (a los que se les atribuye la disminución en el PRC) podían permanecer por mayor tiempo en el medio de cultivo disminuyendo su velocidad de oxidación.

En los cultivos realizados al 50% de OD se observó el mismo comportamiento anteriormente reportado por Hwang y Sinskey (1991) y Eyer and Heinzle (1996). La correlación inversa entre la concentración de células viables y el PRC se muestra en la Figura V.8b. El cambio promedio en el PRC fue de aproximadamente -35 mV con respecto al valor del PRC inicial. En este caso sí se observó un incremento en el PRC cuando se inició la fase de muerte ($+45$ mV). Este fenómeno puede utilizarse para determinar el cambio en el metabolismo de las células o la carencia de algún nutrimento, como ha sido reportado anteriormente por Higareda *et al.* (1997). Estos cambios en el PRC están relacionados con las velocidades de producción y autooxidación de los compuestos reductores presentes en el medio de cultivo. Es decir, durante la fase exponencial de los cultivos, el equilibrio entre la producción de compuestos reductores y su degradación está desplazado hacia la primera (por lo que el PRC disminuye conforme las células crecen). Sin embargo, cuando las células empiezan a morir, la producción de este tipo de compuestos cesa por lo que los compuestos tiólicos que se encuentran en el medio de cultivo se empiezan a autooxidar (formando disulfuros), lo que ocasiona un aumento en el PRC (Hwang and Sinskey, 1991).

El comportamiento del PRC a 300% OD se muestra en la Figura V.8c. En este caso, no se encontró relación alguna entre el PRC y la concentración de células viables durante la fase exponencial de los cultivos. Se considera que este comportamiento se debe a que las condiciones de operación son predominantes sobre el metabolismo reductor de las células. Esto es, a una alta condición oxidante, el sistema refleja el efecto de una alta concentración de oxígeno, cubriendo el efecto de la generación de tioles. Dicho efecto puede deberse a dos posibilidades: primero, la generación de tioles puede suprimirse debido a la alta concentración de oxígeno ó, segundo, la velocidad de autooxidación de estos compuestos es demasiado rápida por lo que no se observan especies reducidas en el medio. Sin embargo, el aumento en el PRC ($+45$ mV), cuando se inicia la fase de muerte en los cultivos, apoya el hecho de una producción continua de tioles durante la fase exponencial y que dicha producción se pierde cuando las células empiezan a morir, incrementando el PRC como sucede en el caso de 50% OD.

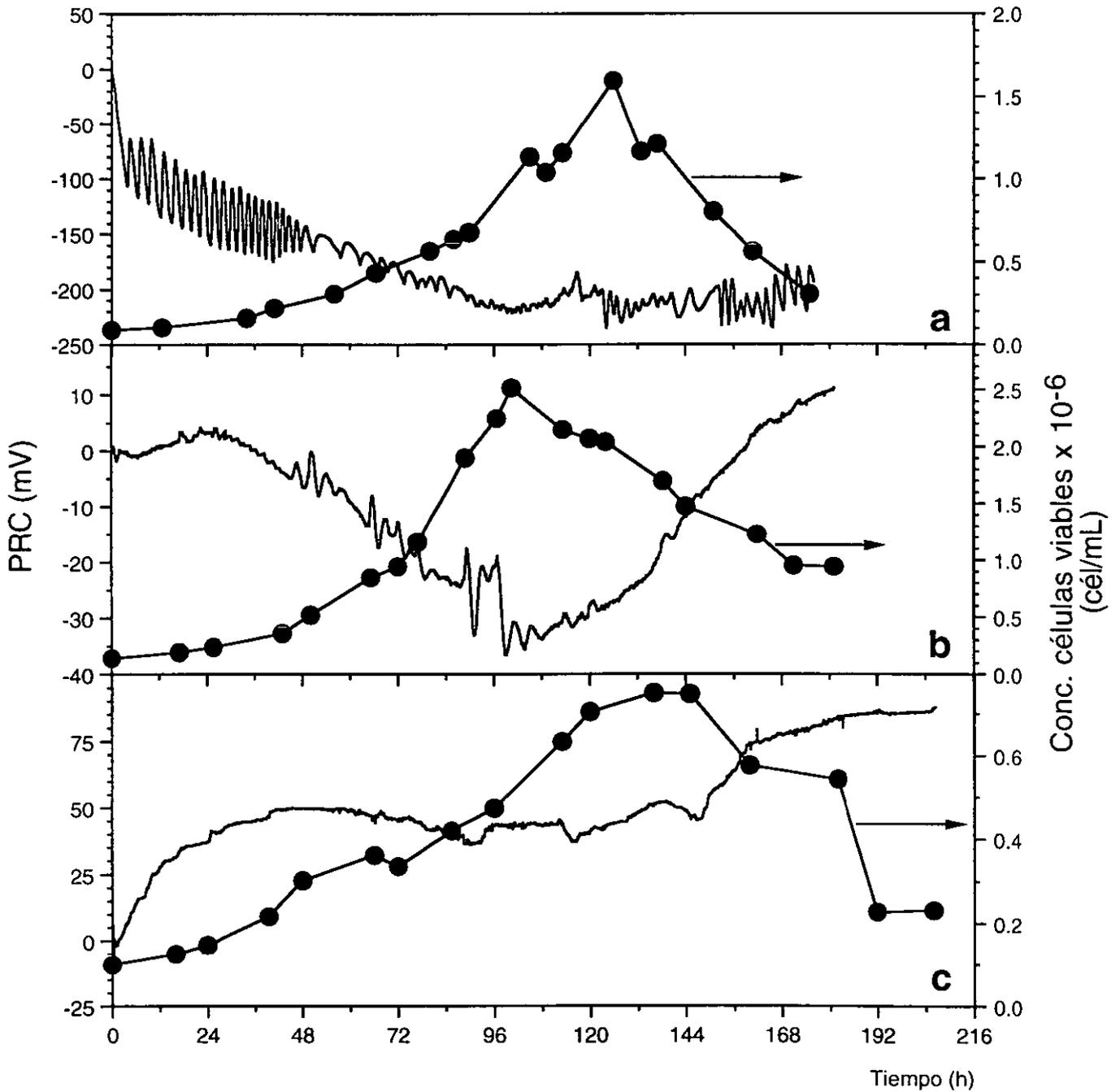


Figura V.8.- Comportamiento del PRC en cultivos a oxígeno disuelto constante. a) 3% OD. b) 50% OD. c) 300% OD.

La relación entre el PRC y la concentración de células viables se ha establecido mediante la siguiente ecuación:

$$\ln(X) = m\text{CRP} + b$$

donde X= células viables/mL.

En la Tabla V.2 se muestran los resultados obtenidos para diferentes concentraciones de OD.

Tabla V.2. Correlación entre el PRC y el número de células viables/mL en la fase exponencial de cultivos de hibridomas murinos.

Autor	% OD	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)	Coefficiente de correlación
Eyer y Heinzle (1996)	50 %	-0.0175	12.30	No reportado
Hwang y Sinsky (1991)	90 %	-0.0384	12.86	No reportado
Este trabajo	3 %	- 0.024	8.834	0.964
Este trabajo	50%	- 0.094	12.059	0.944
Este trabajo	300%	-----	-----	No hay correlación

Las pendientes halladas bajo las mismas condiciones de OD pueden reflejar el metabolismo celular distinto de cada una de las líneas utilizadas, debido a que se ha reportado que cada línea celular (aún cuando todos son hibridomas) tiene diferente capacidad para producir tioles y también el medio de cultivo puede influir en la capacidad redox. Debido a esto, es necesario calibrar el sistema para cada línea celular utilizada y para la condición de OD, ya que, como se observa en la Tabla V.2, tanto la pendiente como la ordenada al origen, cambian en cada caso.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

V.2.3. Control retroalimentado del potencial redox en biorreactor de 1L.

Artículo:

Meneses A., Gómez, A., Ramírez, O.T: (1999). **Feedback control of redox potential in hybridoma cell cultures.** In: Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F, editors. *Animal cell technology: products from cells, cells as products*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 23-27.

FEEDBACK CONTROL OF REDOX POTENTIAL IN HYBRIDOMA CELL CULTURE

A. MENESES, A. GOMEZ, AND O.T. RAMIREZ*

Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México

A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62250 México

Abstract

Culture redox potential (CRP) is an easily measured variable and its utility in hybridoma culture has been recently shown. Nevertheless CRP is scarcely measured as a routine variable in cell culture and very few reports exist of its proper control. In this work we describe, for the first time, a proportional feedback control algorithm based on manipulation of oxygen partial pressure for maintaining CRP at a constant and predetermined value in hybridoma cultures. A broad spectrum of reducing and oxidizing conditions, in the range of -140 mV to 100 mV with respect to the initial CRP, was evaluated by maintaining CRP constant. Cultures were performed in 1-Lt instrumented and computerized stirred bioreactors operated in batch mode. It was observed that cell and MAb concentrations, and specific growth and thiol production rates increased with decreasing CRP. Maximum concentration of ammonium and lactate remained constant at all CRP values tested. Apoptotic cell death was present in the early stage of cultures at oxidative conditions, whereas at a reduced environment it was triggered only until nutrient depletion during late culture stages. Accordingly, oxidative stress was found to be an inducer of apoptosis. The results of this study show that CRP control in animal cell cultures can be exploited to increase productivity, opening a new way to optimize hybridoma cultures.

1. Introduction

The necessity to improve productivity in animal cell cultures has led to the development and design of new strategies, including the improvement of cell lines by genetic modification, design of new bioreactors and agitation systems, establishment of novel control systems, and the analysis of different culture parameters. Culture redox potential (CRP) is an easily measured parameter [2] whose total potential in cell culture has not been fully exploited. As reviewed by Kjaergaard [11], most reports of CRP in biotechnology have focused on microbial fermentations and soil science. CRP can provide valuable information of the status of various cultures and should be considered as a control parameter. Accordingly, strategies based on glucose addition, electric pulses, or agitation manipulation have been proposed to control CRP in microbial cultures [12,18,14].

One of the first reports of CRP in animal cell cultures [3] showed that viable cell concentration and growth rate depended on redox potential of the medium before inoculation. Optimum CRP was found to be in the range of -100 to -60 mV, whereas an oxidant medium (+140 mV to +170 mV) yielded the lowest growth rate. Accordingly, adjustment of medium redox potential was suggested as a suitable strategy prior to inoculation. Daniels et al. [4] also observed a decrease in CRP during exponential growth phase of Earle's "L" cells, but no relationship between these two variables was established.

Various authors have recently shown that hybridoma cell concentration, during exponential growth phase is inversely related to CRP [6, 7, 9, 15]. Therefore, CRP can be used to estimate on-line viable cell concentration. It has been suggested that reduction of cell culture medium by animal cells is due to thiols generation, particularly cysteine, during metabolism [9]. An additional application of CRP measurements in cell culture has been suggested by Higareda et al. [8], who showed that CRP can be used, in combination with oxygen uptake rate (OUR) measurements, to discriminate between metabolic events and operational eventualities. Accordingly, simultaneous measurement of both variables can be used to differentiate glucose or glutamine depletion in hybridoma cultures from mechanical, electrical or instrumentation failures.

In this work we demonstrate the possibility of controlling CRP, at a constant and predetermined value, in hybridoma culture by manipulating oxygen partial pressure through a feed-back control algorithm. To our knowledge, the only attempt to control CRP in cell culture has been by Hwang and Sinskey [9], which was done through the dilution of thiol concentration by the addition of fresh medium to cultures. In the present study, we show the effect of constant CRP on induction of apoptotic death, as well as kinetic and stoichiometric parameters of an hybridoma cell culture.

2. Materials and Methods.

3.1. CELL LINE, CULTURE MEDIUM, AND ANALYTICAL METHODS. .

A murine hybridoma (BCF2) cell line that secretes a neutralizing specific monoclonal antibody (MAb) to toxin 2 of scorpion *Centruroides noxius* Hoffman was used in this study [8]. The medium used was Dulbecco's modified Eagle's supplemented with 4 g/L glucose, 4 mM L-glutamine, 3.7 g/L NaHCO₃, 0.8 mg/L crystalline insulin, 5.5 mg/L sodium pyruvate, 1% nonessential amino acid solution, 1% antibiotic antimycotic solution and 10% (v/v) fetal bovine serum.

Viable and total cell concentration and cell size were determined by Trypan blue staining and Coulter Counter measurements, respectively. MAb production was determined by an ELISA sandwich technique. Glucose, glutamine and lactate concentrations were determined in a YSI 2700 analyzer. Ammonium was measured by Kaplan technique [10]. Thiols were determined by Ellman reaction [5] Apoptotic cell death was identified by acridine orange/ethidium bromide staining [13], flow cytometry [1], and the typical ladder pattern in agarose gels [16].

3.2. BIOREACTOR SYSTEM.

A Virtis 1L bioreactor, with a working volume of 700 ml and equipped with a magnetic bar stirrer, was used in this study. Temperature was maintained at 37° C and agitation at 150 rpm. Sterilizable electrodes for dissolved oxygen (DO) (polarographic),

FEEDBACK CONTROL OF REDOX POTENTIAL

3

pH and CRP (combined platinum-reference) were used. Constant CRP and pH were maintained by an automatic proportional feed-back algorithm that manipulated the individual flows of oxygen, nitrogen and CO₂ through mass flow controllers, while keeping the total gas flow constant at 600 ml/min. Only superficial aeration was employed.

3. Discussion of Results.

A logarithmic relation between CRP and dissolved oxygen concentration, in agreement with Nernst equation [8], was observed. Accordingly, different controller gains (proportional constants) at the various working DO ranges were needed to maintain a suitable CRP control. These constants were calculated using the semi-empirical methods of Ziegler-Nichols and Cohen-Coon [17], and are summarized in Table I. It can be seen that for controlling CRP at reduced values it was necessary to use lower gains due to the stronger influence of DO on CRP. Namely, a small change on DO caused a large variation on CRP, resulting in a very sensitive response even to small variations in oxygen flow rate. In contrast, controlling CRP at oxidative ranges required 10-fold higher gains than those at reducing conditions. In this case, the logarithmic relationship between DO and CRP resulted in the need for higher oxygen flow changes in order to modify CRP.

TABLE I. Proportional control constants for controlling CRP at a fixed and predetermined value.

% DO range	Kc (Ziegler and Nichols)	Kc (Cohen and Coon)
0% - 20%	0.0318	0.0237
0% - 50%	0.0805	0.0626
100% - 200%	1.0013	0.7079

Typical results of the proposed CRP control system for hybridoma culture are shown in Figure 1. In the culture shown, it was possible to maintain CRP at $-130 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$ for 106 h. Afterwards, CRP control was lost due to a drastic decrease in OUR upon glutamine depletion and pH control failure. The observed behavior is in agreement with previous reports by Higareda et al. [8]. A similar tight control in CRP using the proposed algorithm was also possible for a broad spectrum of reducing and oxidizing conditions between the range of -140 mV to 100 mV with respect to the initial CRP. A summary of culture parameters at such conditions is shown in Table II. In contrast to the CRP control strategy proposed by Hwang and Sinskey [9], in this case constant CRP was achieved without the need for diluting the culture medium. This allows the possibility of controlling CRP in batch cultures as well as in perfusion or continuous operation modes. In the latter cases, a CRP control independent of dilution rates, is possible.

As shown in Table II, viable cell concentration, MAb concentration and specific growth rate increased with a reducing environment. This is indicative of a deleterious oxidative stress. In addition, maximum thiol production was observed at reduced values, probably due to lower thiol autooxidation rates and low concentration of oxidative species under such conditions. Maximum concentration of lactate and ammonium were not affected by the various CRP values tested. Specific oxygen uptake rate remained relatively constant at around $3 \times 10^{-10} \text{ mmol/cel-h}$ for CRP in the range of -140 to 40 mV , but increased by more than 3-fold at higher CRP values.

TABLE II. Effect of CRP over kinetic parameters.

CRP (mV)	Cell conc. (10^6) (Viable Cells/ml)	MAb (mg/L)	Thiols (μ M)	μ max (1/h)
-133	1.98	43.46	35.86	0.028
-7	1.16	31.06	29.54	0.026
90	0.43	23.52	20.65	0.021

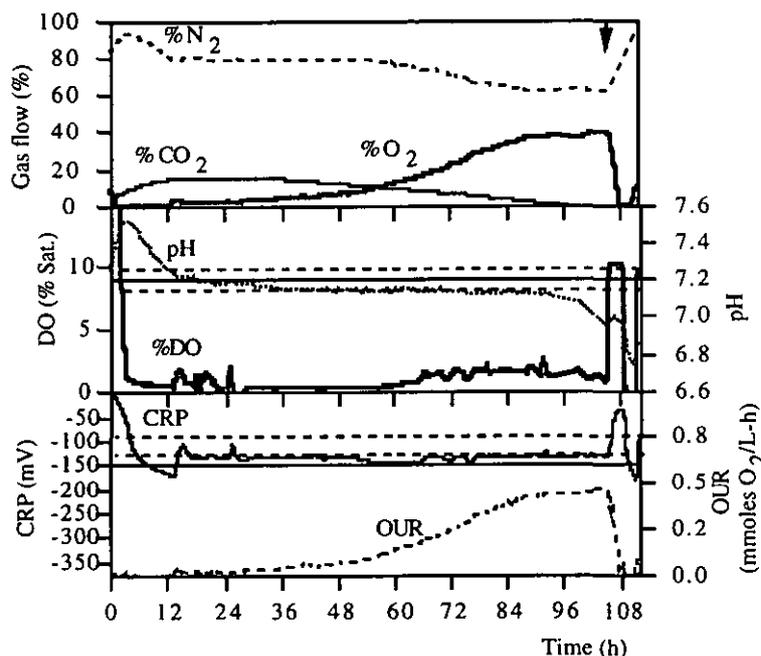


FIGURE 1. – Typical behavior of CRP control . Arrow indicates time of nutrient depletion.

In cultures maintained at reduced conditions, programmed cell death (apoptosis) occurred during the late culture stages (after 96 h). In these cases, apoptosis induction correlated with depletion of glutamine. In contrast, oxidative environments induced the development of apoptotic cell death in the early stages of the culture (before 60 h), even in the presence of non-limiting glucose and glutamine concentration and at non-inhibiting concentrations of lactate and ammonia. In these cases, a very long lag phase was observed (120 hrs). Surprisingly, after such long lag periods, cell growth resumed, although lower growth rates and lower maximum cell concentrations were observed. Such a behavior is indicative of a possible adaptation phenomena of hybridoma cells to the highly oxidative conditions.

4. Conclusions

It was shown that it is possible to control CRP at a predetermined and constant value in a range of -140 mV to 100 mV by manipulating the oxygen partial pressure. The proposed algorithm is based on a simple control scheme that can be easily applied to any

mammalian cell culture under different operation modes. It was found that CRP strongly affects the main hybridoma cell culture parameters, including induction of apoptotic death. These results show that CRP control in animal cell cultures can be exploited to increase productivity and opens novel possibilities to improve hybridoma cultures.

5. Acknowledgments

Support by CONACyT 25164-B. A. M. thanks support CONACyT 93820, DGEP-UNAM and PAEP-202349.

6. References

1. Coligan, J., Krulsbeek, A. M., Marguiles, D.H. Ed. Related isolation procedures and functional assays. Morphological, biochemical and flow cytometric assays of apoptosis. Current Protocols of Immunology. John Wiley and Sons Inc. USA, supplement 16 CPI.
2. Dahod, S.K. (1982). Redox potential as a better substitute for dissolved oxygen in fermentation process control. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 55-56.
3. Daniels, W.F., Garcia, H., Rosensteel, J.F. (1970a). The relationship of oxidation-reduction potential to the growth performance of tissue culture media poised prior incubation. *Biotechnology and Bioengineering*, 12, 409-417.
4. Daniels, W.F., Garcia, H., Rosensteel, J.F. (1970b). Oxidation-reduction potential and concomitant growth patterns of cultures of Earle's "L" cells in centrifuge bottle spinners. *Biotechnology and Bioengineering*, 12, 419-428.
5. Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and physics*, 82, 70-77.
6. Eyer, K., Hienzle, E. (1996). On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 277-283.
7. Griffiths, B. (1984). The use of oxidation-reduction potential (ORP) to monitor growth during a cell culture. *Develop. Biol. Standard*. 55, 113-116.
8. Higareda, A.E., Possani, L.D., Ramfrez, O.T. (1997). The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 56, 554-563.
9. Hwang, Ch., Sinskey, A.J. (1991). The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells in Spier, R.E., Griffiths, J.B. and Meignier, (eds.), *Production of biologicals from animal cells in culture*. B. Halley Court, Oxford, pp. 548-567.
10. Kaplan, A. (1965). Urea, nitrogen and urinary ammonia. *Stand. Methods Clin.* 5, 245 - 256.
11. Kjaergaard, L. (1977). The redox potential: its use and control in biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering*, 7, 131-150.
12. Kjaergaard, L., Joergensen, B.B. (1979). Redox potential as a state variable in fermentation systems. *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, 9, 85-94.
13. Mercille, S., Massie, B. (1994). Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 1140-1154.
14. Oh, D.K., Kim, S.Y., Kim, J.H. (1998). Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 58, 440-444.
15. Plushkell, S.B., Flickinger, M.C. (1996). Improved methods for investigating the external redox potential in hybridoma cell culture. *Cytotechnology*, 19, 11-26.
16. Smith, Ch., Williams, G.T. (1989). Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, 337, 181-184.
17. Stephanopoulos, G. (1984). *Chemical process control*. Prentice Hall Inc. New Jersey. Pp. 352 - 355.
18. Thompson, B.G., Gerson, D.F. (1985). Electrochemical control of redox potential in batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 1512-1515.

V.2.4. Efecto del control del PRC en cultivos por lote de hibridomas.

Se realizaron seis cultivos a condiciones controladas del PRC, abarcando un intervalo desde -133 mV hasta +90 mV, por medio de la manipulación del OD. En todos ellos se evaluaron los diferentes parámetros cinéticos así como la muerte celular. Además, se realizaron cultivos a OD constante, los que se utilizaron como patrones de comparación.

La diferencia entre el control de PRC y el de OD es que en el primer caso se mantiene constante el intercambio electrónico entre el cultivo y el electrodo redox en una manera independiente del suplemento de oxígeno como nutrimento esencial. Este balance electrónico puede tener importancia en la regulación celular así como en la transducción de señales o en los diferentes estados metabólicos de la célula. En el caso de los cultivos con control de OD, el oxígeno es adicionado como un nutrimento y el balance entre el intercambio electrónico no es considerado. Esto es corroborado con el comportamiento del PRC discutido en la sección V.2.2, en el cual dicho intercambio varía a lo largo del cultivo.

En el Apéndice C, se muestran cada una de las cinéticas de metabolismo y cinéticas de control correspondientes a todos los cultivos. A continuación se describe el efecto del control del PRC en cada uno de los parámetros estudiados.

V.2.4.1. En el crecimiento celular y producción de AcMo.

El efecto del control del PRC sobre la máxima concentración celular alcanzada así como sobre la producción de AcMo se muestra en la Figura V.9. La concentración máxima de células totales y viables se presenta en la Figura V.9a. La concentración de células viables más alta se obtuvo al PRC más reductor y dicha concentración disminuyó casi linealmente conforme el PRC se incrementó. Además, la concentración de células totales siguió casi el mismo comportamiento a excepción del valor a -90 mV, el cual fue el máximo. Es necesario señalar que en los cultivos más oxidantes las células no crecieron durante las 132 primeras h (5.5 días) pero sorpresivamente, después de esta fase lag tan larga, los cultivos presentaron una etapa de crecimiento exponencial. Esto es, las máximas concentraciones viables alcanzadas fueron de 1.25×10^6 células/mL a 204 h de cultivo y 0.5×10^6 células/mL a 192 h en cultivos controlados a +50 y +90 mV, respectivamente. Los valores encontrados en esta etapa del cultivo han sido representados por asteriscos en cada gráfica. Los valores que corresponden a las primeras 132 h en estos dos cultivos están representados con los símbolos correspondientes de la gráfica en general. Los valores obtenidos en los cultivos donde se controló el OD se representan como líneas punteadas horizontales en cada figura. Como se muestra en la Figura V.9a, la concentración de células viables máxima para los cultivos control se obtuvo a 50% OD (la cual fue ligeramente menor que el valor máximo alcanzado en el cultivo a PRC

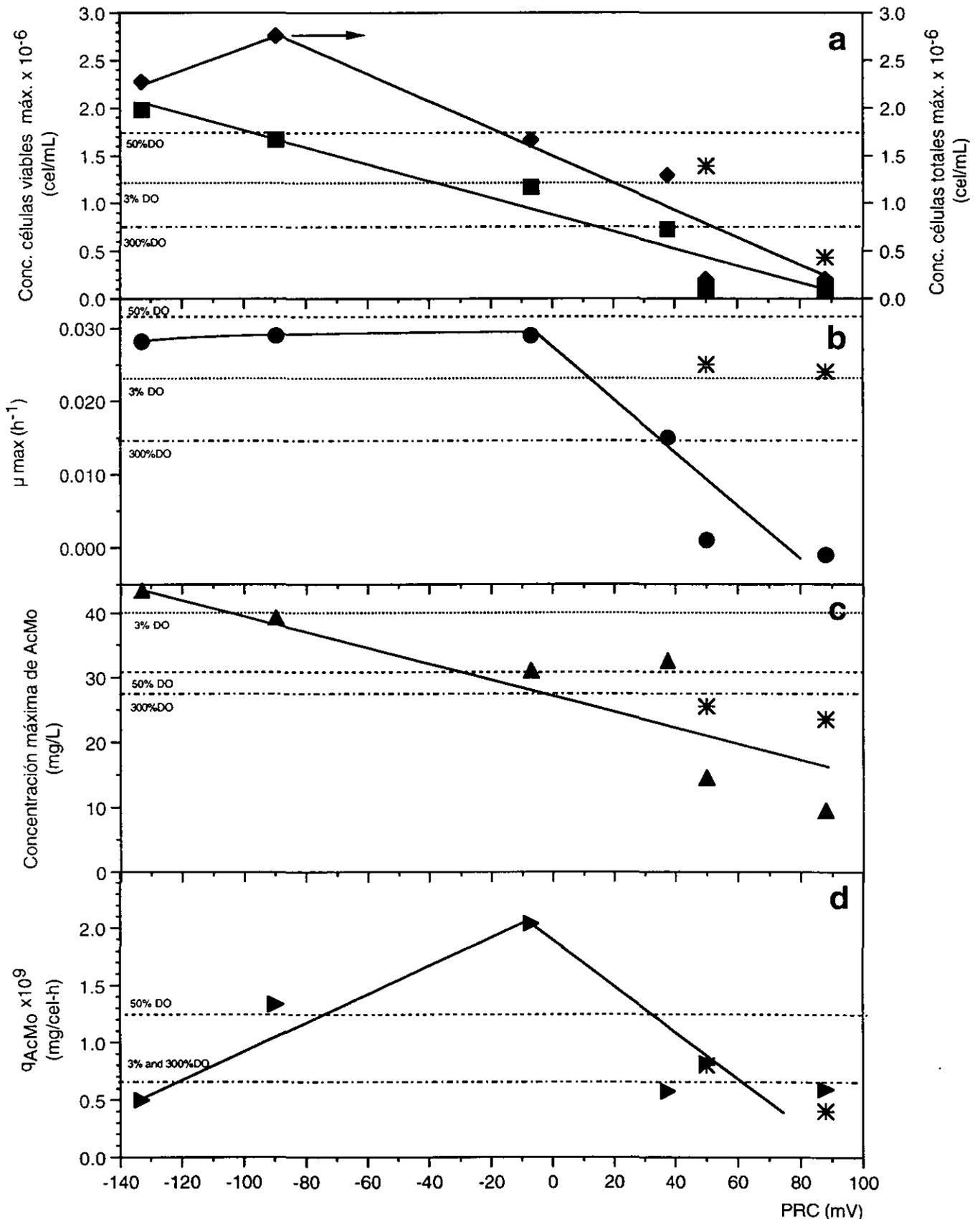


Figura V.9. Efecto del control del PRC en la concentración celular y la producción de AcMo. a) Concentración celular máxima. b) Velocidad específica de crecimiento. c) Concentración máxima de AcMo. d) Velocidad específica de producción de AcMo. Los asteriscos representan los valores alcanzados después de 132 h de fase lag en los cultivos muy oxidantes.

constante), seguido por el valor a 3% OD y finalmente por el valor a 300% OD, el cual fue una tercera parte de la concentración celular viable alcanzada al 50% OD. La explicación del efecto del PRC sobre el crecimiento celular puede relacionarse con la disminución en el daño causado por el ambiente oxidativo. En este caso, dado que el estrés oxidativo es menor, las células no tienen que gastar energía para mantener el redox intracelular para promover un óptimo crecimiento. En todos los casos, el cambio en las condiciones redox fue lo suficientemente gradual para permitir una adaptación previa de las células a las nuevas condiciones de tal manera que el efecto observado es consecuencia de tales condiciones y no de la falta de adaptación por cambios bruscos en el sistema. Miller *et al.* (1987) reportaron previamente que una disminución en el OD permite un incremento en la concentración celular y viabilidad, debido quizá a que las células requieren menor energía de mantenimiento para evitar el daño causado por el estrés oxidativo. Considerando los resultados a PRC constante, tal explicación es consistente a lo que se está reportando. Sin embargo, los resultados a OD constante contrastan con lo reportado por este grupo, debido a que se encontró la mayor concentración de células viables al 50% OD y no al 3% OD. Estos resultados concuerdan con los reportados por Ozturk y Palsson (1990, 1991), quienes reportan que la concentración de células viables permanece constante entre 10% y 80% OD pero disminuye para valores de OD debajo del 5%, concluyendo que tal efecto depende de la línea celular utilizada.

Las máximas velocidades específicas de crecimiento (μ) (Figura V.9b) fueron similares para los cultivos a PRC reductores desde -133 mV hasta los cero mV. Esto es indicativo de que los cultivos reductores alcanzaron su máxima velocidad específica de crecimiento debido a que no hubo daño oxidativo. Sin embargo, bajo condiciones oxidantes, se observó una clara influencia por parte del ambiente ya que a 37 mV la μ disminuyó a la mitad y en los cultivos a 50 y 90 mV, no hubo crecimiento durante las 132 primeras h. En estos últimos casos, el ambiente oxidante inhibió el crecimiento ya que solamente permanecieron vivas y aparentemente durante este periodo pudieron adaptarse al alto estrés oxidativo. Dicha adaptación se observó, como ya se mencionó anteriormente, después de una fase lag tan larga, las células empezaron a crecer, alcanzando valores de μ similares a los encontrados para los cultivos reductores (asteriscos en la Figura V.9b). Tal adaptación muestra que las células pueden cambiar su metabolismo para sobrevivir si encuentran los suficientes nutrientes en el cultivo. Esta última característica marcó la diferencia entre el cultivo a 37 mV y aquellos a 50 y 90 mV, debido a que en el primero, las células pudieron adaptarse al estrés oxidativo y empezar a crecer; sin embargo, la carencia de glutamina y glucosa limitó tal crecimiento. En el caso de los cultivos más oxidantes, existía suficiente cantidad de nutrientes en el medio de cultivo después del periodo de adaptación por lo que las pocas células que sobrevivieron pudieron reestablecer el crecimiento. En los cultivos a OD constante, la μ máxima se halló a 50% OD seguida por el valor del 3% OD. en tales tres condiciones la μ se encontró dentro

del promedio de los valores obtenidos a PRC controlado. La μ a 300% OD fue la más baja de los tres cultivos y su valor no fue más de la mitad que el alcanzado al 50% OD. En este caso se observa que en tales cultivos no se presentó una adaptación a las condiciones de estrés, por lo que en este caso es posible diferenciar entre el efecto del OD y el PRC.

El efecto del control del PRC sobre la producción de AcMo se muestra en la Figura V.9c. Las máximas concentraciones de AcMo se obtuvieron a los valores más reductores, como consecuencia de la mayor concentración de células viables. Es decir, a una mayor cantidad de células viables, una mayor cantidad de AcMo producido. Conforme el PRC se incrementó, la concentración de AcMo disminuyó casi linealmente. A 37 mV se observó una alta concentración de AcMo, aunque la velocidad específica de producción fue menor debido a que la μ fue menor en este cultivo. Este resultado podría ser consecuencia del estrés oxidativo al cual las células se sometieron. Algunos reportes han mostrado que una alta condición de estrés puede causar un incremento en la producción de AcMo. En los cultivos más oxidantes, la concentración obtenida de AcMo fue similar a la obtenida al inicio de los cultivos durante las primeras 132 h. Una vez adaptadas las células al alto estrés oxidativo, la producción de AcMo se incrementó al doble (asteriscos en la Figura V.9c); sin embargo, tales concentraciones fueron más bajas que las obtenidas a condiciones reductoras. Estos resultados coinciden parcialmente con aquellos reportados por Miller *et al.* (1987) y por Ozturk y Palsson (1991) para cultivos a OD constante. Contrastando con nuestros resultados, ellos reportan un aumento en la concentración de AcMo conforme el OD se incrementó hasta alcanzar un máximo de 50% y 30% respectivamente. En cultivos con OD más alto se observó una disminución en la cantidad de AcMo producido, lo que coincide con nuestros resultados. En cultivos a OD constante, la máxima concentración de AcMo se encontró a 3% OD, seguida por el valor a 50% OD y finalmente por el cultivo a 300% OD, correlacionando este último valor con lo esperado debido a la baja concentración celular obtenida. En estos casos, no se observó un incremento en el valor de la concentración máxima a 50% y 30% OD de acuerdo con lo reportado con Miller *et al.* (1987) y Ozturk y Palsson (1991). Estos resultados pueden ser consecuencia de que la viabilidad celular siempre fue alta en el cultivo al 3% OD, mientras que en el caso de los autores anteriormente mencionados, ellos reportan una disminución en ésta, como consecuencia de la adaptación celular a la baja condición de OD.

Como se muestra en la Figura V.9d, la velocidad específica de producción de AcMo (q_{AcMo}), incrementó linealmente conforme el PRC fue mayor, hasta alcanzar un máximo a -7 mV, donde disminuyó drásticamente en todas las condiciones oxidantes. Este comportamiento puede estar relacionado con el equilibrio entre la energía asignada para crecimiento y la asignada para producir

algunas proteínas tales como el AcMo. Una explicación alternativa podría ser el balance intracelular para la expresión de la proteína. Esto significa que bajo condiciones reductoras, las células conducen toda su energía al crecimiento debido a que no hay ningún estrés oxidativo que inhiba su metabolismo pero, conforme el PRC se incrementa, las células crean un balance entre su crecimiento y la síntesis de proteínas que no se utilizan en el crecimiento celular, como es el caso del AcMo. Las q_{AcMo} obtenidas después de la larga fase lag (asteriscos en la Figura V.9.d) fueron similares a las encontradas durante las primeras 132 h, indicando que en estos casos, las células estaban produciendo el AcMo continuamente a la misma velocidad siendo ésta muy baja. La disminución de las q_{AcMo} en condiciones oxidantes, podría ser consecuencia de una inhibición de las enzimas que participan en la síntesis del AcMo o como consecuencia de que las células tienen que reparar el daño causado debido al estrés oxidativo incrementando la energía de mantenimiento en lugar de aplicar energía a la producción de AcMo. A OD constante, el cultivo al 50% OD tuvo la máxima q_{AcMo} de las tres condiciones, pero su valor fue casi la mitad de aquel hallado a -7 mV en los cultivos a PRC constante. Las q_{AcMo} a 3% y 300% de OD fueron similares y sus valores eran comparables con aquellos encontrados a condiciones muy reductoras y muy oxidantes. Estos resultados coinciden con los reportados por Miller *et al.* (1987), quienes observaron un valor máximo en la q_{AcMo} alrededor del 50% OD. Como se explicó anteriormente para los cultivos con PRC constante, estos resultados podrían ser consecuencia del establecimiento del equilibrio entre la energía de mantenimiento, la de crecimiento y la de producción de proteínas.

La estabilidad del AcMo determinada por geles de acrilamida no-reductores y no-desnaturalizantes (datos no mostrados) demostró que bajo ninguna condición del PRC controlado hubo degradación del AcMo. Tampoco se observó efecto de degradación en cultivos a OD constante. Una ligera aglomeración de AcMo representada por la presencia de multímeros se observó en los cultivos a 50% OD y -133 mV. Este fenómeno podría ser causado por la unión no específica entre moléculas de AcMo (fuerzas de Van del Waals y de afinidad sin la formación de uniones estables).

V.2.4.2. En el metabolismo de glucosa.

El efecto del PRC sobre el metabolismo de glucosa se muestra en la Figura V.10. La velocidad específica de consumo de glucosa ($q_{glucosa}$) fue poco afectada por el PRC como se muestra en la Figura V.10a. En los cultivos reductores, ésta permaneció casi constante entre $30-40 \times 10^{-11}$ mmoles/cel-h, para posteriormente incrementar ligeramente conforme el PRC incrementaba hasta alcanzar un valor máximo en el cultivo más oxidante (de 60×10^{-11} mmoles/cel-h). Dichos valores ligeramente más altos a los reportados por Ozturk y Palsson (1991) ya que ellos reportan valores alrededor de 30×10^{-11} mmoles/cel-h como máximo a 1% de OD pero se encuentran en el mismo

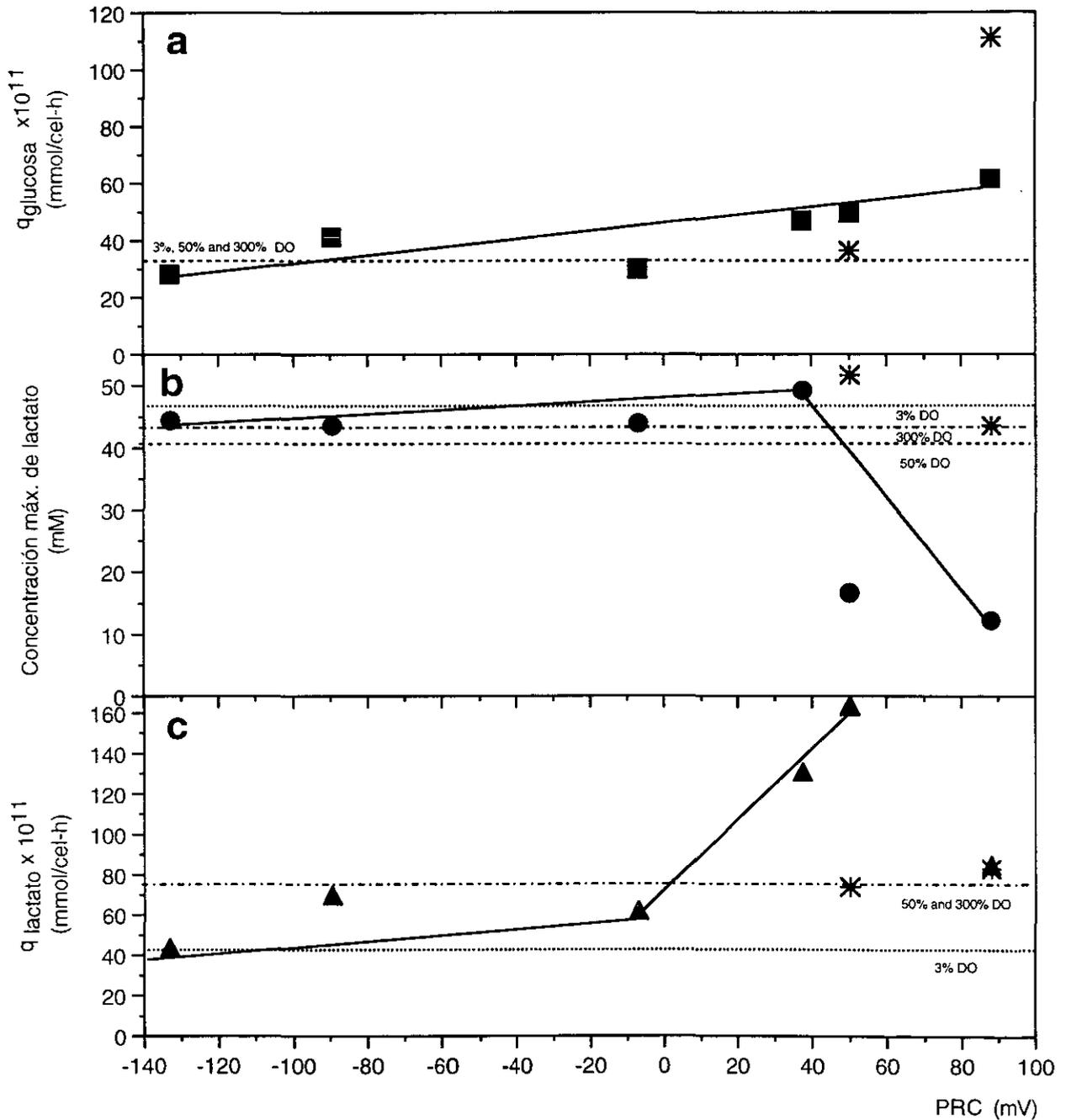


Figura V.10.- Efecto del control del PRC sobre el metabolismo de glucosa. a) Velocidad específica de consumo de glucosa. b) Máxima concentración de lactato producido. c) Velocidad específica de producción de lactato. Los asteriscos representan los valores alcanzados después de 132 h de fase lag en los cultivos muy oxidantes.

orden de magnitud. Este comportamiento fue más pronunciado en la fase exponencial de los cultivos más oxidantes, después de la larga fase lag, como muestran los asteriscos de la Figura V.10a. En líneas de alto crecimiento celular (como son los hibridomas), el ligero aumento en la q_{glucosa} puede ser consecuencia de la limitación en el consumo de glucosa por la vía de los ácidos tricarbóxicos, debido a que la ruta de glicólisis se utiliza principalmente para producción de lactato. Este evento es independiente del crecimiento celular, por lo que las velocidades de consumo de dicho nutrimento tienden a permanecer constantes. Este fenómeno también se observa en el caso de los cultivos con OD constante, en los que la q_{glucosa} permaneció constante. Una explicación alternativa del aumento en la q_{glucosa} en los cultivos más oxidantes es el uso de la glucosa como fuente de carbono principal para generar poder reductor en tales condiciones (Ozturk y Palsson, 1991) y para producir mayor energía de mantenimiento para regular la homeostasis de la célula, con la finalidad de poder controlar el PRI para sobrevivir, dadas las altas condiciones oxidantes de su entorno.

Las concentraciones máximas de lactato (Fig. V.10.b) permanecieron relativamente constantes entre 42 y 47 mM en los cultivos con PRC menores a 40 mV. Sin embargo, éstas disminuyeron a 10-15 mM en las condiciones más oxidantes. Cuando los cultivos empezaron a crecer, dichas concentraciones alcanzaron valores similares a aquellos encontrados para las condiciones reductoras (asteriscos en la Figura V.10b). Las máximas concentraciones alcanzadas en los cultivos a OD constante fueron similares a las de los cultivos reductores. Correlacionando estos resultados con las velocidades de consumo de glucosa, es posible sugerir que la baja concentración de lactato producido en los cultivos más oxidantes en relación con un ligero incremento en las q_{glucosa} , es debido a que la energía generada por la glucosa pudo derivarse a energía de mantenimiento. Esto también se corrobora debido a que en estos puntos, los rendimientos de lactato con respecto a glucosa disminuyeron (datos no mostrados). Sin embargo, cuando las células se adaptaron a las condiciones oxidantes, éstas generaron mayor cantidad de lactato por célula, reflejando un cambio en el metabolismo celular. Esta aseveración está relacionada con el comportamiento de la velocidad específica de producción de lactato (q_{lactato}), la cual se incrementó de 40×10^{-11} mmoles/cel-h en los cultivos más reductores [estos son similares a los reportados por Ozturk y Palsson (1991) para cultivos a OD constante] a 160×10^{-11} mmoles/cel-h en el cultivo a 50 mV. A 90 mV, el valor de q_{lactato} , tanto en la fase lag como en la exponencial del cultivo, fue similar a aquellos calculados para los valores reductores. En el caso de los cultivos a OD constante, se observó que a 50 y 300% OD, las q_{lactato} fueron similares, y el valor más bajo se obtuvo a 3% de OD. Estos resultados contrastan con lo reportado anteriormente (Miller *et al.*, 1987; Ozturk y Palsson, 1991), quienes observaron que a bajas concentraciones de OD se promueve un aumento en las q_{glucosa} y q_{lactato} , como

consecuencia de un metabolismo anaeróbico. Esto se explica considerando que en el caso de los experimentos reportados en este trabajo, las concentraciones de OD en los cultivos no fueron limitantes.

V.2.4.3. En el metabolismo de glutamina.

El efecto del PRC sobre el metabolismo de glutamina (gln) se muestra en la Fig.V.11. Las velocidades específicas de consumo de glutamina ($q_{\text{glutamina}}$) se muestran en la Figura V.11a. Los valores de este parámetro se encontraron en un intervalo de $4 - 7 \times 10^{-11}$ mmoles/cel-h en los cultivos reductores y hasta 37 mV, donde un incremento de 3 y 6 veces se presentó en los cultivos de 50 mV y 90 mV respectivamente. En la fase exponencial de estos dos últimos cultivos, dicha velocidad disminuyó a valores similares de los cultivos reductores (asteriscos en la Figura V.11a). En el caso de los cultivos con control de OD, los valores encontrados fueron similares a aquellos con control de PRC. En todos los casos, los valores concuerdan con lo reportado en la literatura (Ozturk y Palsson, 1991). Considerando que la glutamina es la principal fuente de poder reductor en las células de hibridomas, era de esperarse que las $q_{\text{glutamina}}$ permanecieran casi constantes a valores de PRC reductores y que se presentara un incremento en cultivos oxidantes, ya que en el caso de los primeros no era necesario un alto consumo de gln, debido a que el daño oxidativo era bajo y quizá el requerimiento de poder reductor era también bajo. Sin embargo, a valores oxidantes, la generación de NADPH y NADH tenía que ser lo suficiente alta para permitir que las células sobrevivieran y al menos se mantuvieran durante la fase lag tan larga. Una vez que las células se adaptaron a las nuevas condiciones oxidantes, los consumos de gln se asemejaron a los obtenidos en cultivos reductores. Este fenómeno puede ser consecuencia de que una vez que las células adaptaron su metabolismo a las altas condiciones oxidantes, la energía requerida fue menor para subsanar el daño por estrés oxidativo, por lo que el consumo de gln disminuyó. Alternativamente, puede suceder que las altas $q_{\text{glutamina}}$ encontradas fueran consecuencia de la descomposición de la glutamina del medio de cultivo sin crecimiento celular. Se ha reportado previamente (Miller *et al.*, 1987), que la oxidación de gln es incompleta a bajas condiciones de OD, causando una disminución en los valores de $q_{\text{glutamina}}$. Tal observación contrasta con los resultados de este trabajo, debido a que en este caso, el oxígeno no fue un nutrimento limitante en el sistema. En los cultivos a OD constante, las $q_{\text{glutamina}}$ fueron independientes de la concentración de oxígeno tal y como lo reportan Ozturk y Palsson (1991).

Las máximas concentraciones de amonio (Figura V.11b) fueron similares en los cultivos reductores, permaneciendo en un intervalo de 3 a 4 mM en cultivos por debajo de 40 mV. En el caso de los cultivos más oxidantes, dado que el crecimiento celular fue muy bajo durante las primeras 132 h del cultivo, se obtuvo baja cantidad de amonio (2 mM). Una vez que los cultivos se

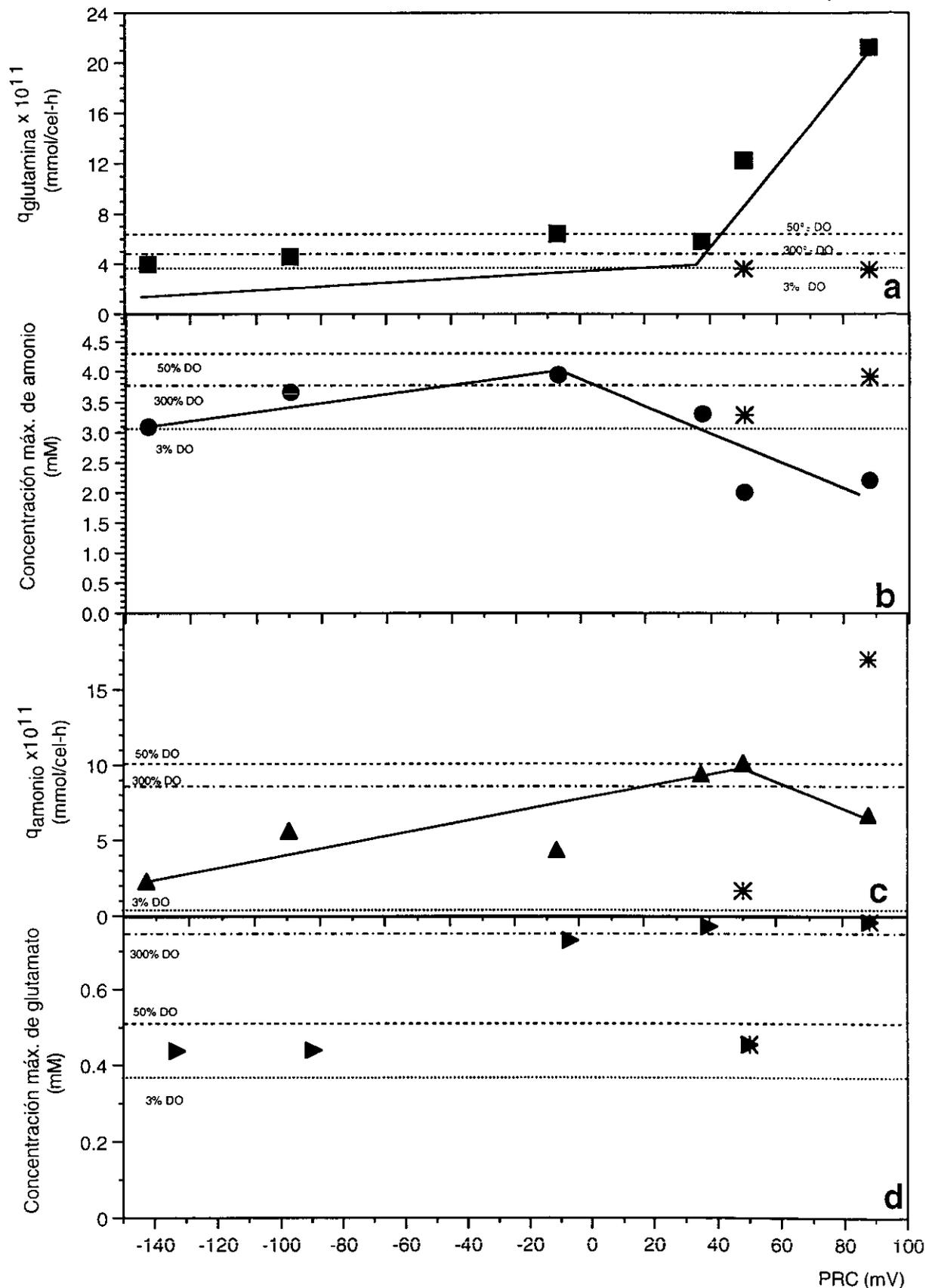


Figura V.11. Efecto del control del PRC sobre el metabolismo de glutamina. a) Velocidad específica de consumo de glutamina. b) Máxima concentración de amonio producido. c) Velocidad específica de producción de amonio. d) Máxima concentración de glutamato producido. Los asteriscos representan los valores alcanzados después de 132 h de fase lag en los cultivos muy oxidantes. 94

adaptaron a las condiciones oxidantes, la concentración máxima de este metabolito alcanzó valores similares a los de los cultivos reductores (asteriscos en la Figura V.11b). En los cultivos a OD controlado, la concentración más alta de amonio fue a 50%, seguida por la de 300% y por la de 3%. En estos casos, los valores fueron semejantes a los hallados en cultivos reductores. En este caso, se considera que sucedió lo mismo que con el lactato; es decir, se alcanzaron concentraciones similares a los valores reductores, lo que refleja su relación con el metabolismo de gln. Sin embargo, para poder establecer una comparación, se consideraron las q_{amonio} , las cuales se presentan en la Figura V.11c. En este caso, se observa que se presentó un incremento gradual (de 2 a 10×10^{-11} mmoles/cel-h) conforme el PRC aumentó y en el valor más oxidante, se presentó una ligera disminución en dicho valor. Tal incremento indica la relación entre el consumo de gln y la generación de amonio como un subproducto de su metabolismo (Villaseñor, 1998). Durante la fase exponencial de los cultivos a 50 mV y 90 mV, la q_{amonio} no presentó una correlación clara con el PRC. Mientras que en los cultivos con control de OD, la menor q_{amonio} se obtuvo a 3% OD (0.4×10^{-11} mmoles/cel-h), siendo éste el valor más bajo encontrado en todos los cultivos. Los valores obtenidos para los cultivos de 50% y 300% estuvieron alrededor de 10×10^{-11} mmoles/cel-h, similares a los observados en cultivos oxidantes.

Las máximas concentraciones de glutamato se muestran en la Figura V.11d. La concentración de glutamato permaneció casi constante e igual a 0.45 mM a valores reductores por abajo de -20 mV. Sin embargo, a valores oxidantes, esta concentración aumentó a 0.75 mM en los cultivos con PRC mayor a -20 mV. Las concentraciones de glutamato durante la fase exponencial de los cultivos más oxidantes fueron similares a aquellas observadas durante las primeras 132 h del cultivo (asteriscos en la Figura V.11d). La generación de glutamato también está relacionada con el metabolismo de glutamina y con el de tioles (que se discutirá posteriormente), ya que se genera durante el metabolismo de la primera pero se utiliza en el intercambio con cistina por el sistema Xc⁻ (Bannai, 1984; Bannai *et al.*, 1989). Este intercambio se incrementa cuando las células se someten a condiciones oxidantes debido a que es necesario mantener el PRI en un valor óptimo para evitar el daño oxidativo. En los cultivos a OD controlado, la concentración máxima de glutamato se encontró a 300% OD, siendo el valor similar al de las condiciones oxidantes. El valor a 50% OD fue similar a aquellos encontrados en condiciones reductoras. Finalmente, a 3% OD, la concentración de glutamato fue ligeramente menor a las de los cultivos en condiciones reductoras. Estos resultados corroboran el intercambio que se da entre el glutamato y la cistina, ya que a menor poder reductor se observa menor concentración de glutamato en el medio de cultivo, aún cuando la concentración celular era más alta. El hecho de que a condiciones reductoras y a baja concentración de OD se obtengan menores concentraciones de glutamato implica también que bajo estas condiciones

ambientales. dicho intercambio no es necesario, ya que el PRI puede mantenerse debido a que el daño oxidativo es mínimo.

V.2.4.4. En el metabolismo de tioles.

El efecto del PRC sobre el metabolismo de tioles se muestra en la Figura V.12. La máxima concentración de tioles (Figura V.12a) disminuyó desde aproximadamente 40 mM hasta 20 mM conforme el PRC aumentó. En las condiciones más oxidantes, las concentraciones máximas alcanzadas fueron similares en la fase lag y en la fase exponencial conforme se muestra con los asteriscos de la Figura V.12a. La concentración de tioles más alta se encontró a 3% OD. Los valores para 50 y 300% de OD (30 y 35 μ M) fueron similares a aquellos encontrados en los cultivos a PRC intermedio, siendo el valor para 300% OD más pequeño que para 50% OD. Este comportamiento indica que bajo condiciones muy reductoras o con baja cantidad de OD en el medio de cultivo, es posible la presencia de los compuestos tiólicos como una especie reductora. Conforme el PRC se incrementa (y se incrementa por tanto el OD), se presenta la autooxidación de los compuestos tiólicos debido a que son muy inestables (Hwang y Sinskey, 1991), formando sus correspondientes disulfuros (Glacken *et al.*, 1989), los cuales permanecen en el cultivo por mayores períodos de tiempo. Además, la generación de tioles también está relacionada con la concentración de células viables, de tal manera que a mayor concentración viable, mayor concentración de tioles (debido al metabolismo reductor de este tipo de células). De tal manera que la generación de tioles es una consecuencia del balance intracelular para mantener el PRI en equilibrio y en un valor óptimo para el plegamiento de proteínas y muchas vías metabólicas dependientes del redox (Hwang y Sinskey, 1991). En este intercambio se sabe que están involucradas por lo menos dos rutas. Por un lado, el sistema Xc⁻, el cual involucra un intercambio entre la cistina y el glutamato y, por otro, el sistema ASC, que involucra el intercambio de cisteína por medio de una vía dependiente de sodio (Bannai, 1984). Este intercambio es dependiente del potencial redox o del equilibrio redox entre las especies tiólicas y las disulfúricas del medio de cultivo (SH/SS) (Hwang *et al.*, 1992). La importancia de este intercambio radica en que la cisteína es requerida para la síntesis de proteínas y es el precursor limitante en la síntesis de glutatión, siendo éste el compuesto más importante para mantener el PRI (Meister, 1988; Zmuda y Friedenson, 1983). Es importante hacer notar que la disminución en la concentración de tioles en relación con el número de células viables se debe en mayor medida a la autooxidación de éstos que al intercambio con el medio de cultivo, ya que las concentraciones de glutamato permanecen prácticamente constantes en valores muy oxidantes, indicando que el intercambio de especies reductoras permanece alto.

En la Figura V.12b, se presentan las velocidades específicas de producción de tioles (q_{tioles}). Estas fueron casi constantes entre 20 y 40 μ moles/cel-h para los cultivos con control del PRC y en los del

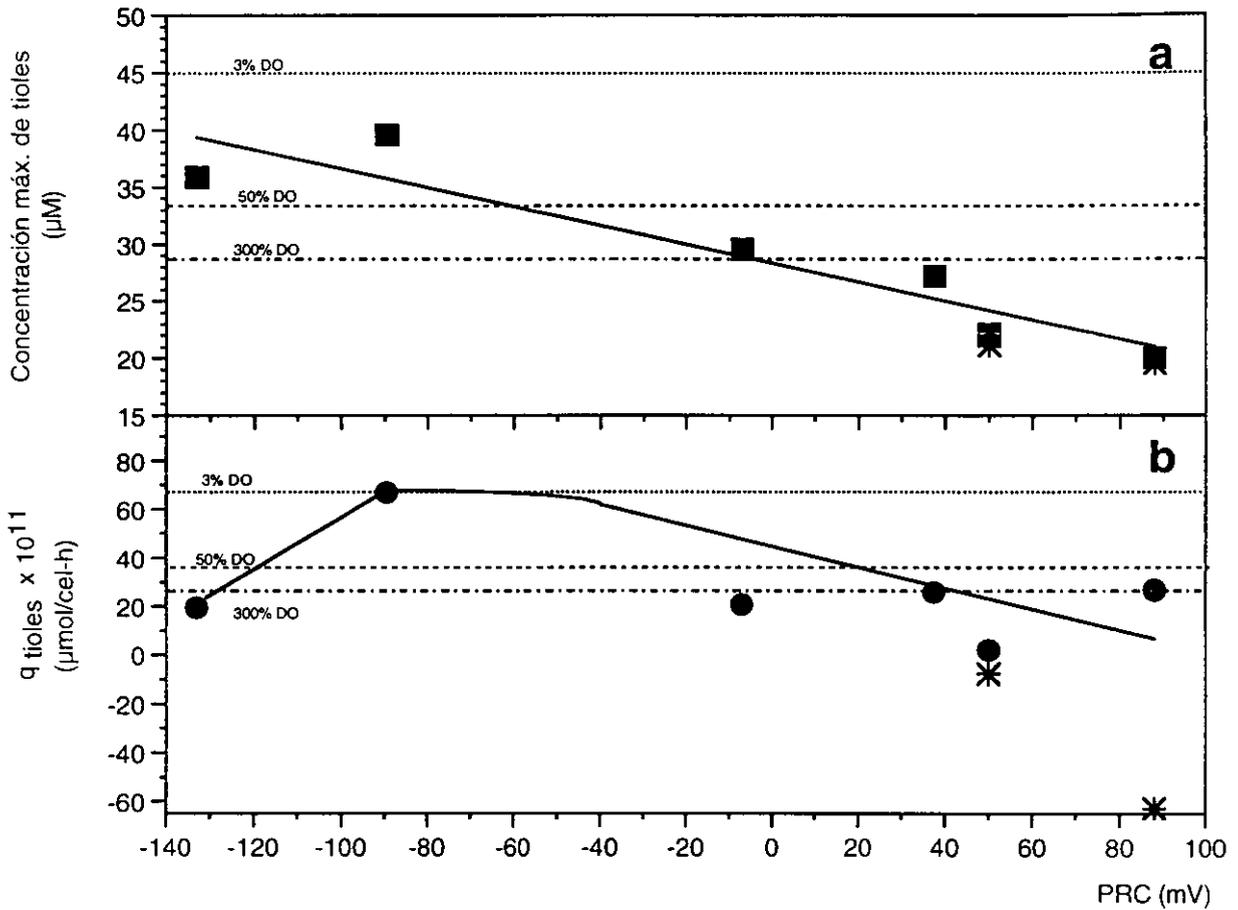


Figura V.12. Efecto del control del PRC sobre la producción de tioles. a) Máxima concentración de tioles. b) Velocidad específica de producción de tioles. Los asteriscos representan los valores alcanzados después de 132 h de fase lag en los cultivos muy oxidantes.

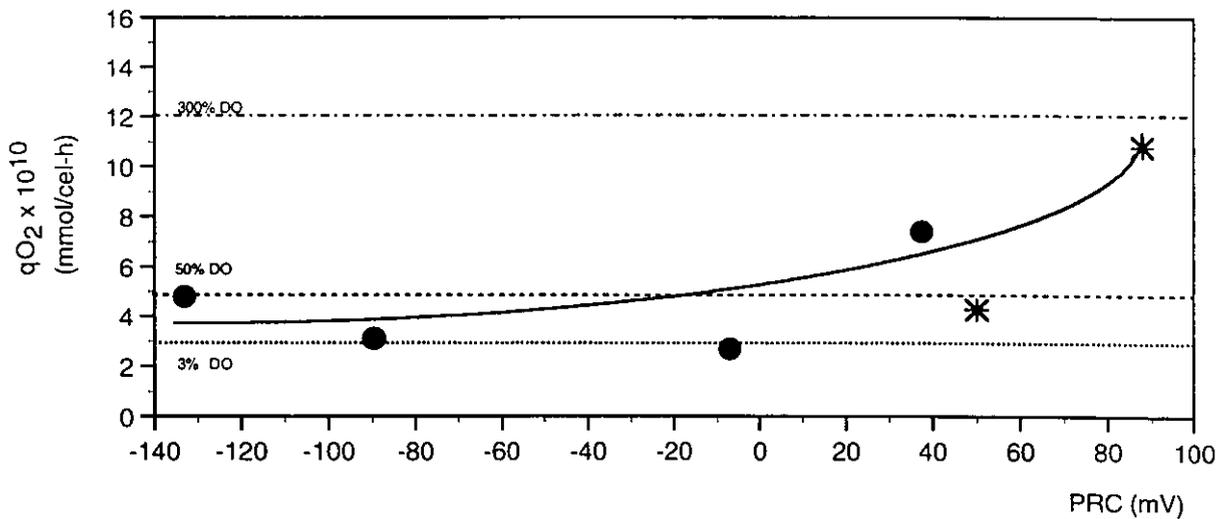


Figura V.13. Efecto del control del PRC sobre el consumo de oxígeno. Los asteriscos representan los valores alcanzados después de 132 h de fase lag en los cultivos muy oxidantes. (No se reporta el valor en la fase lag de los cultivos oxidantes debido a que no fue posible calcularlos por la baja demanda de oxígeno en esta etapa).

50 y 300% OD. En el cultivo a -90 mV donde se obtuvo un incremento de 3.5 veces el valor promedio al igual que para el cultivo a 3% OD. Durante la fase exponencial de los cultivos más oxidantes (asteriscos en la Figura V.12b), se obtuvo una disminución en la generación de tioles, de tal manera que más que generación pareciera ser consumo o degradación de estos compuestos. El hecho de que las q_{tioles} permanecieran prácticamente constantes en todos los cultivos, puede ser consecuencia de que se presentó un equilibrio entre las especies reductoras y las oxidantes en la mayoría de éstos. Tal equilibrio compensó el intercambio con aminoácidos y la autooxidación de las especies tiólicas. En el caso de los cultivos muy oxidantes, se observa que dicho equilibrio se mantuvo durante la fase lag. Sin embargo, al empezar a crecer la células, y dado el prolongado período de tiempo que permanecieron en el cultivo las especies tiólicas, la autooxidación fue mayor que la generación de especies reductoras por lo que las q_{tioles} disminuyeron de manera drástica.

V.2.4.5. En el metabolismo de oxígeno.

La velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) con respecto al PRC se representa en la Figura V.13. Como se muestra, los valores obtenidos permanecieron entre 3 y 5 x 10⁻¹⁰ mmoles O₂/cel-h para los cultivos reductores, siendo valores típicos reportados para células de mamífero (Miller *et al.*, 1988). Mientras que para los valores oxidantes se presentó un aumento gradual hasta alcanzar 12 x 10⁻¹⁰ mmoles O₂/cel-h en el cultivo a 90 mV. En cultivos con control de OD, la más alta q_{O_2} se obtuvo a 300% OD y fue de 12 X 10⁻¹⁰ mmoles O₂/cel-h. Tal valor fue 4 veces mayor al encontrado para 3% OD y aprox. 2.5 veces mayor al de 50%, siendo un valor muy alto a lo reportado para células animales. El incremento en la capacidad de consumir oxígeno es dependiente de la adaptación de la célula a altas condiciones de estrés oxidativo por un prolongado periodo de tiempo. Es decir, en aquellos cultivos en donde el OD se mantuvo en un alto y estrecho intervalo por un periodo de tiempo largo (de acuerdo con la Figura V.5), la velocidad específica de consumo de oxígeno incrementó. Mientras que en aquellos cultivos en los que el OD varió de 50% a 380%, la q_{O_2} disminuyó. En el cultivo donde el OD se controló a 300% durante toda la cinética, la q_{O_2} alcanzó un valor máximo. Esto muestra, que la capacidad adaptativa de las células tuvo que ser mayor mientras se sometieran a OD más alto sin variación. En valores reductores, la q_{O_2} permaneció sin variación reflejando que el oxígeno no fue un nutrimento limitante para este tipo de cultivos.

V.2.4.6. En la muerte celular

Durante los últimos años, el papel del estrés oxidativo con relación a la muerte celular programada ha sido controversial. Existen reportes que avian que el estrés oxidativo puede actuar como inductor de señales que llevan a cabo el desenlace de la célula a través del mecanismo de apoptosis

(Hockenberry *et al.* 1993; Buttke y Sandstorm, 1994), mientras que otros opinan que el estrés oxidativo juega un papel no esencial dado que a condiciones de bajo estrés oxidativo también es posible observar apoptosis (Shimizu *et al.*, 1995; Mercille and Massie, 1994). Avances dentro del área de biología celular han demostrado que la inducción de apoptosis puede llevarse a cabo por varios procesos de señalización siendo unos dependientes y otros independientes del balance redox intracelular.

La cinética de muerte celular a diferentes PRC se muestra en la Figura V.14. En este caso, la determinación de la muerte celular se realizó por tinción con AO/EB (figura V.14a) y por el porcentaje en la disminución de tamaño (Figura V.14b), como previamente se reportó en la sección V.1.2 (Meneses-Acosta *et al.*, 2001). No se reportan todos los cultivos para facilitar la interpretación de resultados.

En los cultivos a -133 mV (los cuales eran los más reductores), la apoptosis se presentó una vez agotadas la glutamina y la glucosa (datos no mostrados) a las 72 h, concordando con lo reportado por Mercille y Massie (1994). En este caso, una vez que se presentó el agotamiento de glutamina, también hubo una disminución en la velocidad volumétrica de consumo de oxígeno (datos no mostrados) corroborando lo reportado por Higareda *et al.* (1997), quienes muestran que este parámetro junto con el PRC pueden indicar en línea la presencia de un evento metabólico. Cuando se presentó este fenómeno, también el tamaño celular disminuyó más del 10% con respecto al diámetro máximo en el cultivo (Figura V.14b), lo cual correlaciona con la aparición de un mayor porcentaje de células apoptóticas en el cultivo (Figura V.14a). A un PRC mayor, como es el caso del cultivo a -7 mV, la muerte celular se incrementó cuando se presentó la carencia de glutamina (96 h) aunque en este caso la glucosa no se agotó. De la misma manera, se observó una disminución de tamaño una vez agotado tal nutriente. Sin embargo, el tiempo de aparición de la muerte apoptótica fue más tardío (Figura V.14a) debido a que la concentración celular fue menor que en el cultivo más reductor, por lo que el nutriente tardó mayor tiempo en agotarse.

En el cultivo a 37 mV ocurrió la muerte celular después de las 96 h. En este caso, ambos nutrientes esenciales estaban presentes indicando una inducción de apoptosis por la condición oxidante. Además, la disminución del tamaño celular fue más gradual que en el caso de los cultivos reductores (Figura V.14b). Esta inducción por estrés oxidativo fue corroborada en el cultivo más oxidante. En éste, es claro que la muerte celular se desencadenó de manera prematura aún en presencia de los nutrientes esenciales (Figura V.14a) causando una disminución de tamaño del 30-40% con respecto al diámetro máximo (Figura V.14b). Debido al alto porcentaje de muerte apoptótica al inicio del cultivo, éste presentó una fase lag muy prolongada (132 h). Sin embargo, después de este largo período de tiempo, la muerte celular disminuyó debido a la adaptación y al

crecimiento celular (los datos anteriormente reportados como asteriscos corresponden a esta fase). Con ello, demostramos que el estrés oxidativo es un inductor de la muerte celular programada, corroborando lo reportado por Buttke y Sandstrom (1994). Una vez adaptados los cultivos a las condiciones oxidantes, la fase de crecimiento exponencial ocurrió aproximadamente durante 60 h (de 132 h a 192 h). Después de éste período, las células empezaron a morir, debido a la carencia de nutrimentos (glucosa y glutamina), desencadenando de nuevo, la muerte apoptótica (Figura V.14).

Se observó que cuando las células murieron por estrés oxidativo, la disminución de tamaño con respecto al diámetro máximo, fue mayor del 30% y alcanzó una disminución máxima del 40%. Mientras que cuando las células murieron por carencia de nutrimentos, la disminución en el tamaño celular fue mayor al 10% pero menor al 30%. En todos los casos se identificó a la apoptosis como el principal tipo de muerte, siendo corroborados los resultados por el patrón típico de escalera presente en geles de agarosa, así como los análisis por citometría de flujo.

En todos los cultivos a OD controlado, la apoptosis sucedió después del agotamiento de la glucosa y la glutamina. En el caso del cultivo a 300% OD, la fase lag no fue tan larga como en las condiciones más oxidantes pero la concentración celular alcanzada fue similar a las de estos cultivos. En este cultivo, la disminución de tamaño mayor al 10% (indicativo de la presencia de apoptosis) se presentó después de las 140 h, después de que los nutrimentos se agotaron y no como consecuencia del estrés oxidativo. La disminución máxima del tamaño fue del 30% corroborando la aparición de apoptosis por falta de nutrimentos.

Con los resultados obtenidos, se refuerza el argumento de que la muerte celular programada puede ser desencadenada por dos estímulos diferentes aún en el mismo cultivo, siendo el principal la carencia de nutrimentos pero uno alternativo, la alta condición oxidante.

V.2.5. Cinéticas con antioxidantes.

Con la finalidad de establecer otras alternativas de control del PRC, además de la manipulación en el OD y el pH, se realizaron cinéticas de crecimiento con diferentes antioxidantes y oxidantes. Los antioxidantes utilizados fueron el 2-mercaptoetanol, la cisteína, el suero fetal bovino (debido a que se ha reportado que contiene un alto contenido de tioles) y el glutatión reducido. Así como también se utilizó el peróxido de hidrógeno como agente oxidante. En todos los casos el medio utilizado contenía 10% de SFB. Los resultados para cada uno de estos casos se discuten a continuación.

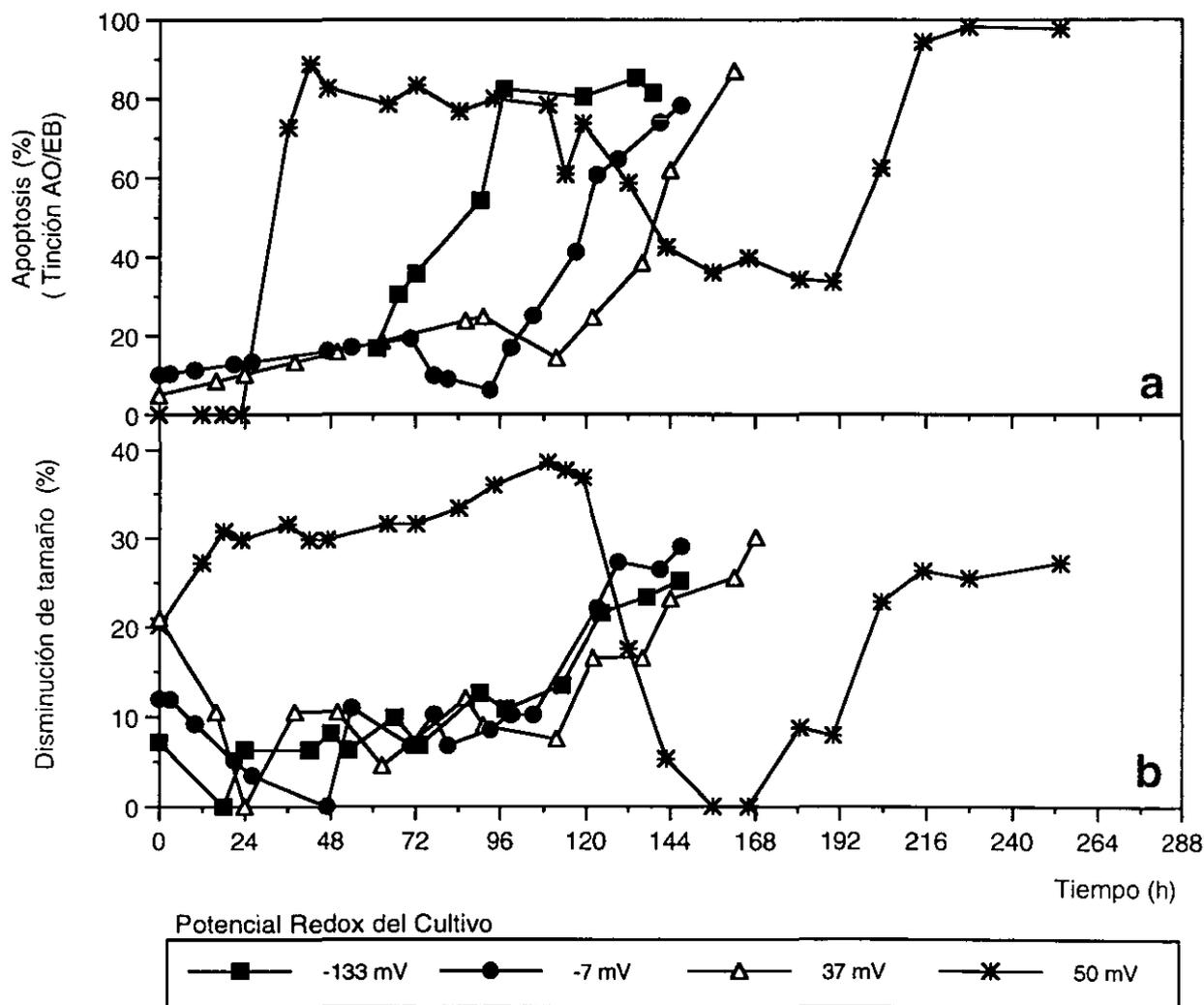


Figura V.14. Efecto del control del PRC sobre la muerte celular. a) Tinción con AO/EB. b) Disminución del tamaño celular con respecto al diámetro máximo.

V.2.5.1. 2-Mercaptoetanol (2-ME).

Inicialmente se determinó la concentración letal de 2-ME sobre el cultivo, con la finalidad de conocer cual era la capacidad de la célula de soportar el poder reductor de este compuesto. Los resultados se muestran en la Figura V.15. Como se muestra, la concentración máxima de 2-ME que las células soportaron sin afectar el crecimiento celular fue menor a 1 mM. Esta concentración fue la máxima aceptada, tanto en cultivos suplementados cada tercer día, como en cultivos con adición inicial de 2-ME. Es necesario hacer notar que estos cultivos se realizaron en frascos estáticos, en los que se observó que el 2-ME se evaporaba conforme avanzaba el cultivo. Realizando la medición de tioles, se determinó que la concentración del antioxidante disminuyó un 50% después del tercer día, por lo que se decidió ajustar la concentración en este período. De acuerdo con la Figura V.15, se observa que el efecto letal del compuesto se presenta desde el inicio del cultivo, mientras que aquellos cultivos por abajo de la concentración letal (1 mM) se comportan de manera similar al cultivo control. Asimismo, las velocidades específicas de crecimiento, de consumo de nutrimentos y de producción de anticuerpo monoclonal fueron similares al cultivo control en aquellos que se encontraban por debajo de la concentración letal. La medición de la estabilidad de la proteína producida (determinada por Western Blot) mostró que el AcMo no se desnaturizó bajo las condiciones reductoras sometidas. El efecto del 2-ME sobre la muerte celular se presenta en la Figura V.16. A las 120 h de cultivo, los porcentajes de células viables y de células necróticas (menores al 10%) fueron similares en todos los cultivos, sin embargo, el porcentaje de células apoptóticas tempranas (superior al 10%) fue más alto con respecto al control en todos los cultivos adicionados con 2-ME aunque el porcentaje de apoptosis total (aproximadamente 35 a 40% fue similar en todos los casos). La presencia de un mayor número de apoptóticas tempranas puede ser efecto de un desencadenamiento más tardío de la apoptosis en los cultivos adicionados con 2-ME, ya que en el cultivo control a esta hora la población celular ya se encontraba predominantemente en apoptosis tardía. La Figura V.17 (columnas 8 y 9) muestra que el principal tipo de muerte en los cultivos suplementados con 2-ME fue la apoptosis. En la columna 8 se muestra la cinética de 3 días para una concentración de 0.1 mM de 2-ME, mientras que en la 9 se muestra la cinética con 0.2 mM de 2-ME. En ambos casos se observa el patrón de escalera característico de apoptosis, aunque también hay degradación inespecífica del ADN de mayor peso molecular. Se ha reportado (Ishii *et al.*, 1981) que el 2-ME tiene la capacidad de incrementar el consumo de cistina en células dependientes de tioles como es el caso de la línea L1210, produciendo un aumento en el glutatión intracelular. Este efecto puede provocar un incremento en el número celular de aproximadamente 5 veces en tres días. Así también, ha sido reportado por Ohmori y Yamamoto (1983a) que el 2-ME incrementa la respuesta en cultivos *in vitro* de anticuerpos de linfocitos murinos contra eritrocitos de borrego, debido a que estimula el consumo de cistina. En nuestro caso, no observamos ningún efecto sobre producción de AcMo ni sobre crecimiento, solamente apreciamos que la muerte celular

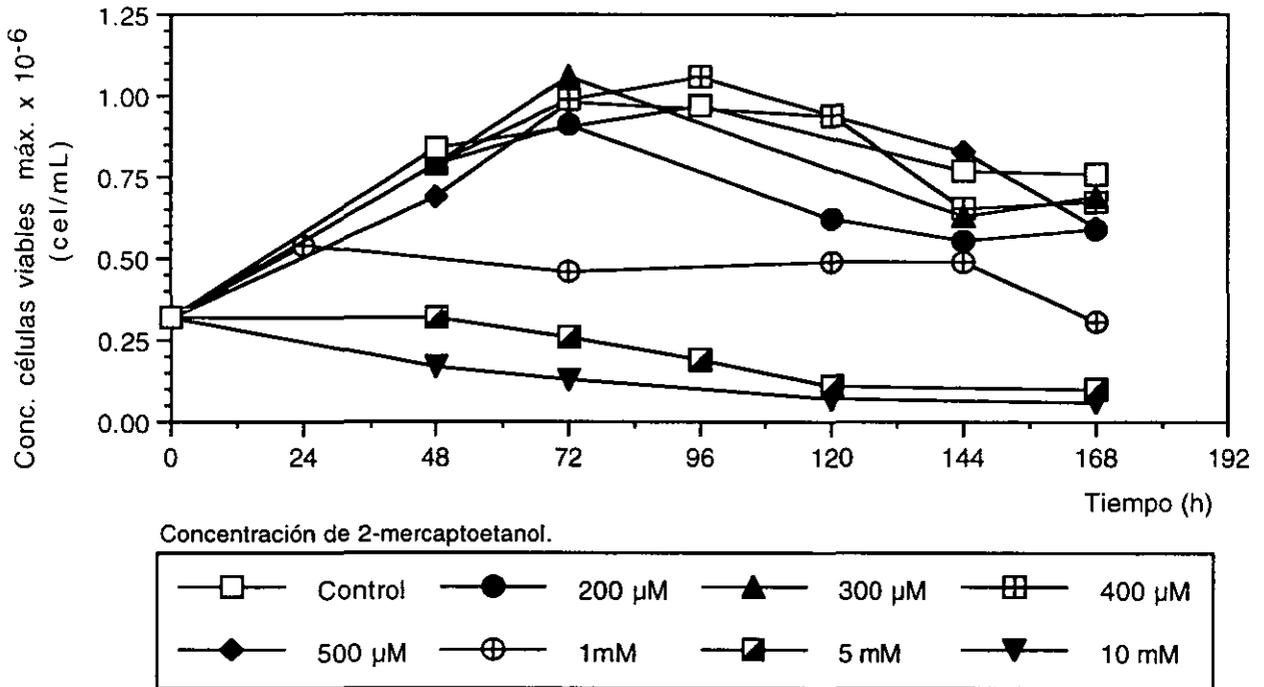


Figura V.15. Efecto del 2-mercaptoetanol sobre la concentración de células viables en cultivos estáticos.

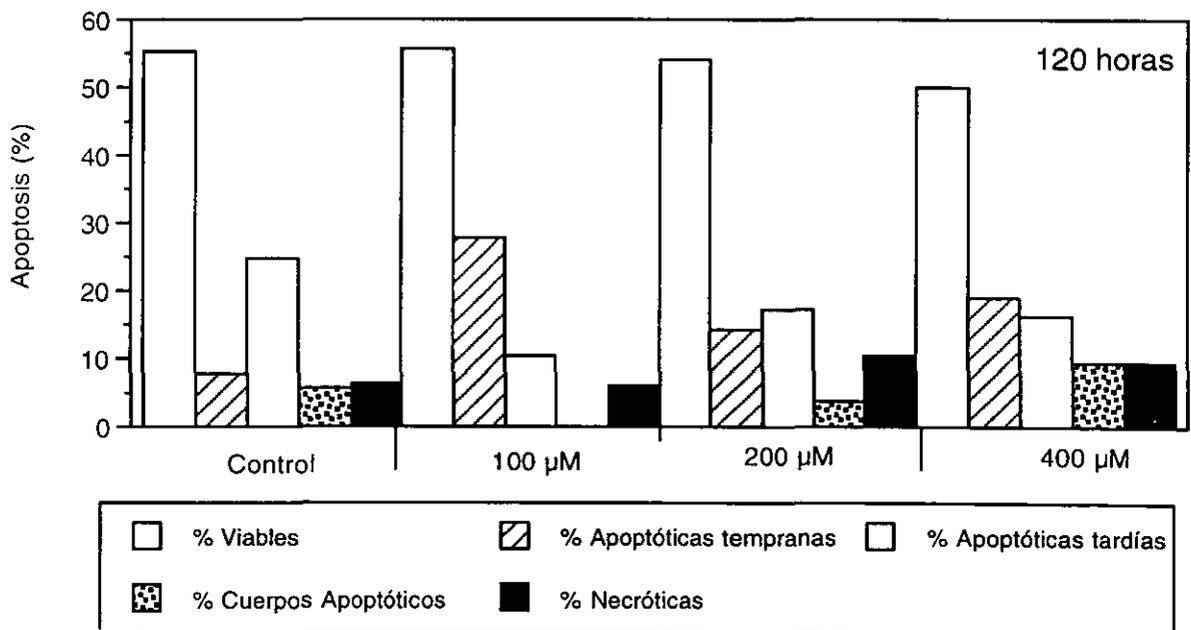


Figura V.16. Efecto del 2-mercaptoetanol sobre la muerte celular a las 120 h de cultivo.

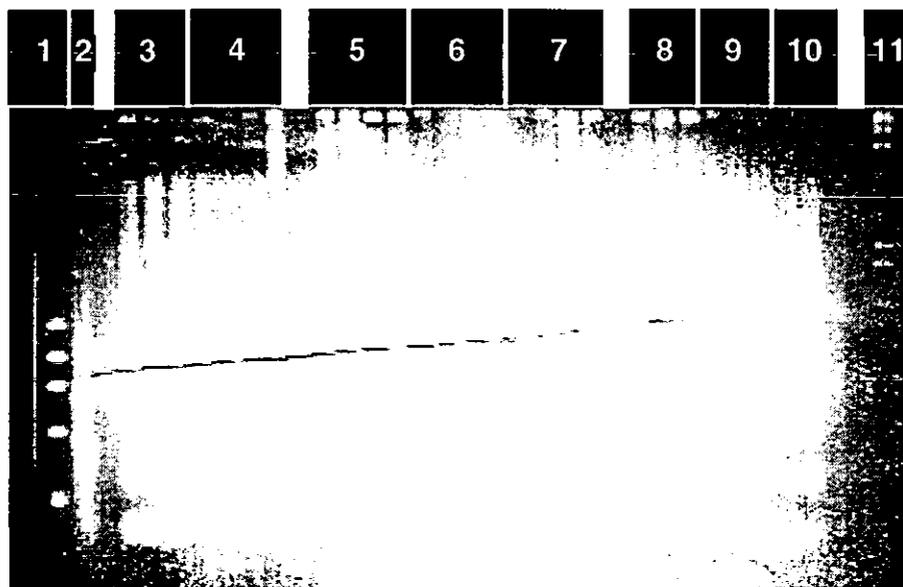


Figura V.17. - Determinación del tipo de muerte en cultivos con antioxidantes.

Carriles: 1) Marcador de peso molecular. 2) Control positivo de necrosis. 3) Controles de apoptosis inducida con Actinomicina D. 4) Cinética de 48, 72, 120 y 170 h con 0.2 mM de cisteína. 5) Cinética de 48, 72, 120 y 170 h con 0.4 mM de cisteína. 6) Cinética de 48, 72, 120 y 170 h con 1 mM de cisteína. 7) Cinética de 48, 72, 120 y 170 h con 2 mM de cisteína. 8) Cinética de 72, 120 y 170 h con 0.1 mM de 2-ME. 9) Cinética de 72, 120 y 170 h con 0.2 mM de 2-ME. 10) Cinética de 72, 120 y 192 h con 20% de SFB. 11) Marcador de peso molecular.

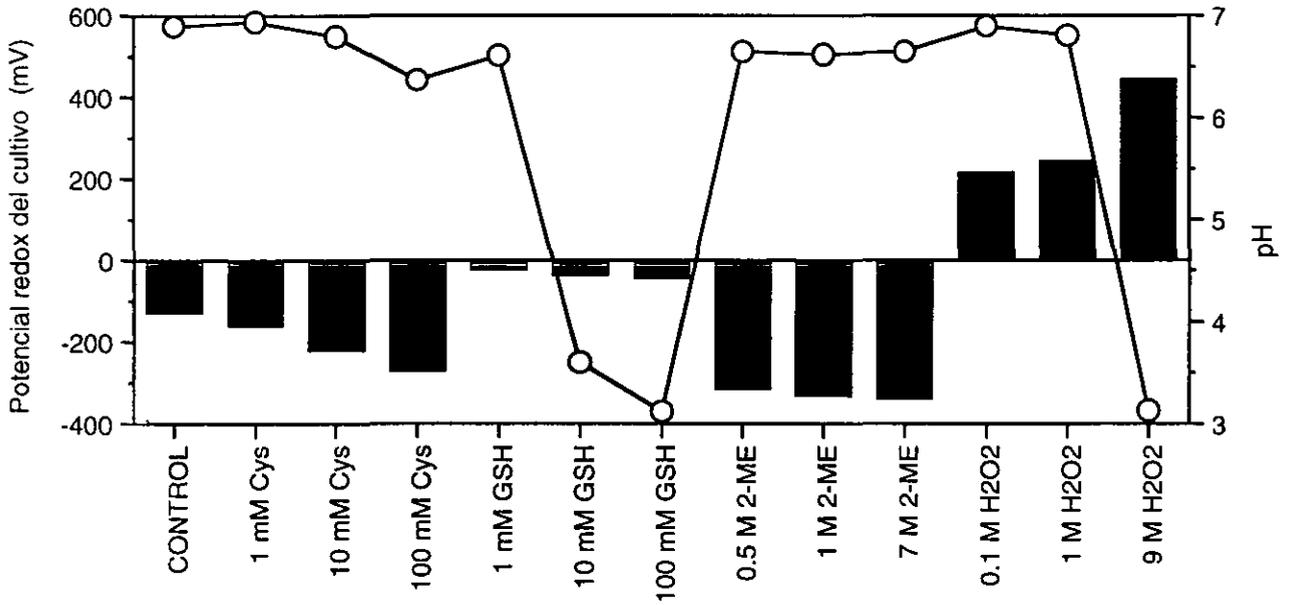


Figura V.18. Efecto de antioxidantes y oxidantes sobre el potencial redox del cultivo y el pH. PRC.- Barras. pH.- Círculos.

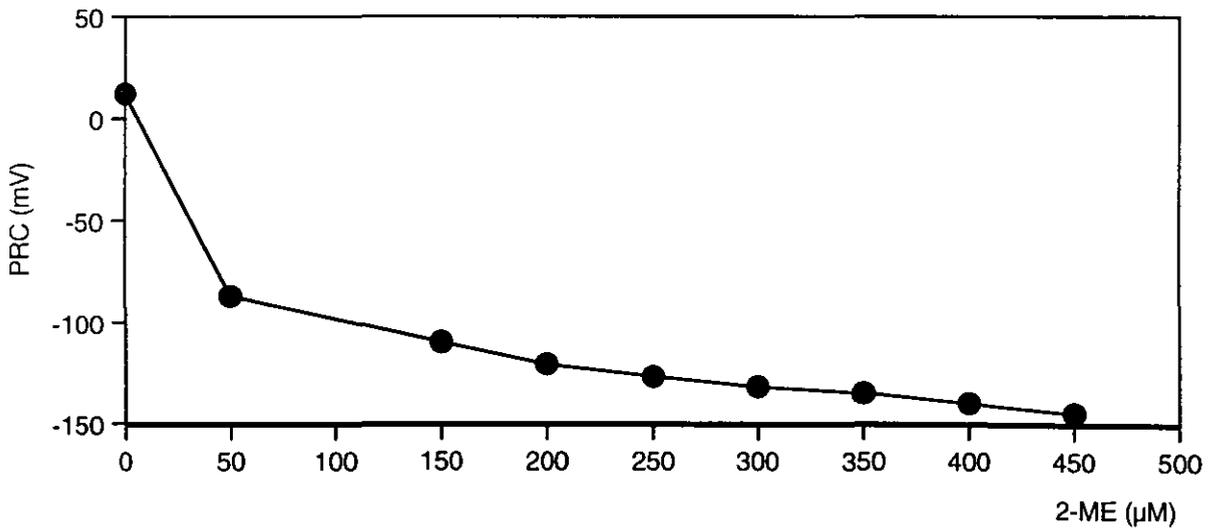


Figura V.19. Efecto de la adición gradual de 2-ME al medio de cultivo sobre el PRC.

parece presentarse más lentamente que en el cultivo control, dada la presencia de un más alto porcentaje de células en apoptosis temprana ya que este porcentaje en todos los casos fue superior al 40% mientras que en el cultivo control fue del 20% (Figura V.16).

Por otra parte se midió el cambio en el potencial redox de cultivo provocado por la adición de 2-ME. Estos experimentos se hicieron en un reactor con 50% de OD y pH 7.2. Tal y como se observa en la Figura V.18, cuando se adicionó una concentración alta de 2-ME (500 μM en adelante) el cambio en el PRC fue drástico a -300 mV, sin afectar el pH; pero cuando la adición del antioxidante se hizo por pulsos de 50 μM (Figura V.19), el cambio en el PRC fue solamente de -90 mV y, aunque la concentración se incrementó hasta alcanzar 450 μM , el cambio no excedió los -150 mV. Considerando que el 2-ME es un agente altamente reductor que rápidamente reacciona con el oxígeno del medio (de hecho, se observó una disminución en el OD, al adicionar el 2-ME), lo que pudo haber sucedido en el primer caso, es que el equilibrio no se alcanzó rápidamente por lo que el PRC cambió drásticamente. Sin embargo, en el segundo caso, la adición gradual de este compuesto ocasionó que se llegara a un equilibrio redox entre el 2-ME reducido y el 2-ME que era oxidado por el oxígeno, por lo que el PRC no disminuyó como en el primer caso. Además, debido a la agitación del medio de cultivo, la oxidación y/o evaporación de dicho compuesto fue más rápida que en los frascos estáticos, obteniéndose una pendiente de desorción/oxidación de 50 $\mu\text{M}/\text{h}$ (datos no mostrados). Esto nos indica que si se quiere controlar el PRC por medio de adición de 2-ME será necesario dar pulsos de este compuesto en altas concentraciones en períodos de tiempo cortos lo cual puede repercutir en la toxicidad sobre el cultivo así como el riesgo que traería sobre la salud el hecho de estar respirando este compuesto continuamente.

V.2.5.2. Cisteína (Cys).

De manera similar al 2-ME, se desarrollaron experimentos con diferentes concentraciones de cisteína en frascos estáticos, debido a que se sabe que este aminoácido es el limitante en la síntesis de glutatión. Como se muestra en la Figura V.20a, la concentración de células totales fue similar en todos los casos, a excepción de la concentración de 2 mM de cys ya que el compuesto se precipitó en el medio de cultivo y ocasionó lisis celular. Sin embargo, la concentración máxima de células viables (Figura V.20b) fue mayor en todos los cultivos suplementados con cys. El consumo de glucosa y la producción de lactato fueron similares en todos los casos, así como la producción de AcMo (datos no mostrados). La estabilidad del AcMo no fue afectada por este agente reductor. En la Figura V.17 (Columnas 4, 5, 6 y 7) se muestra que el principal tipo de muerte en este caso también fue la apoptosis. En cada columna se muestra una cinética de los cultivos desde las 48 h, como se aprecia, aún a esta hora hay un ligero patrón de escalera de ADN en los cultivos indicando la presencia de apoptosis desde etapas tempranas. Aún en el caso de que hubo precipitación de cys a 2 mM,

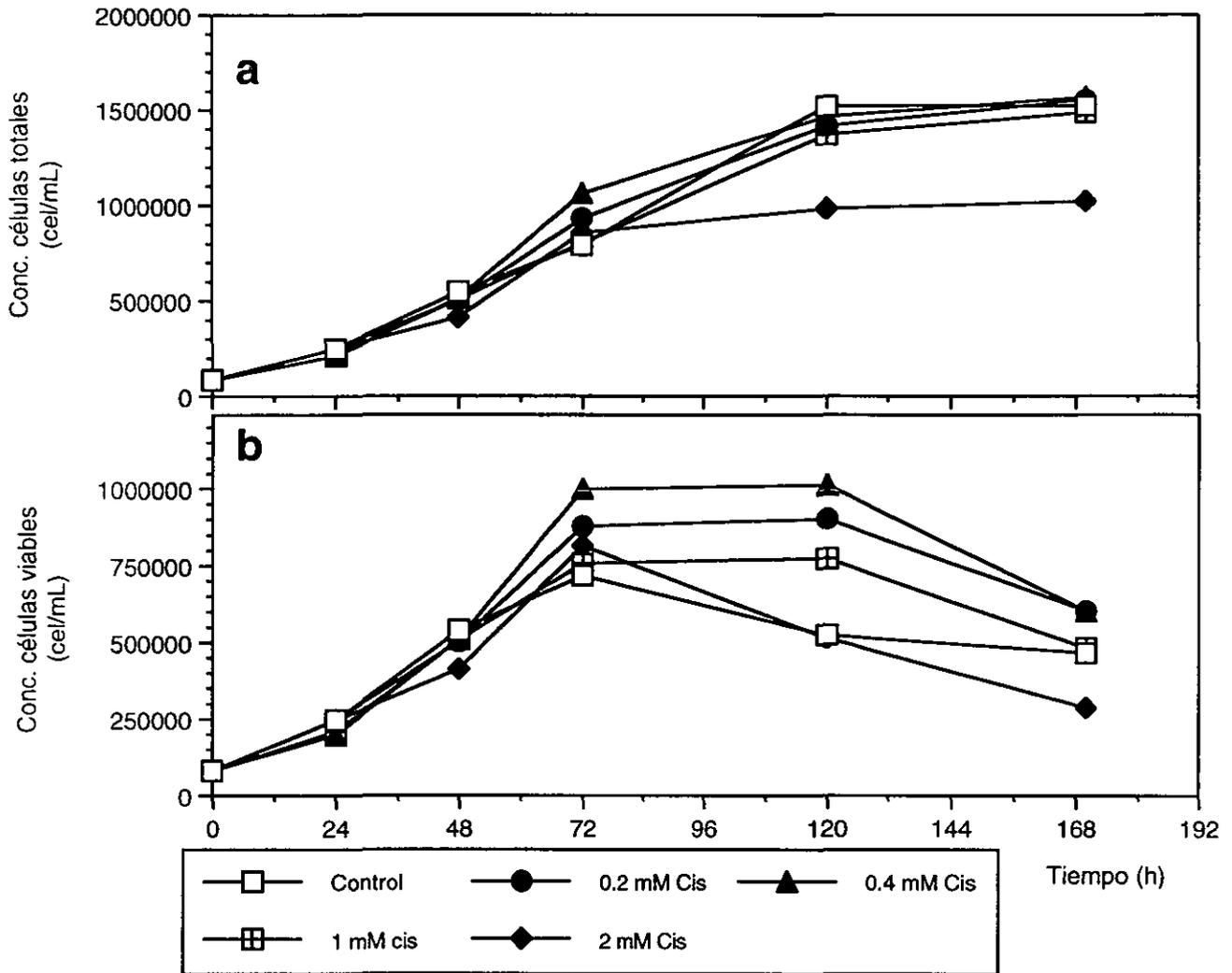


Figura V.20. Efecto de la concentración de cisteína sobre el crecimiento celular. a) Células totales. b) Células viables.

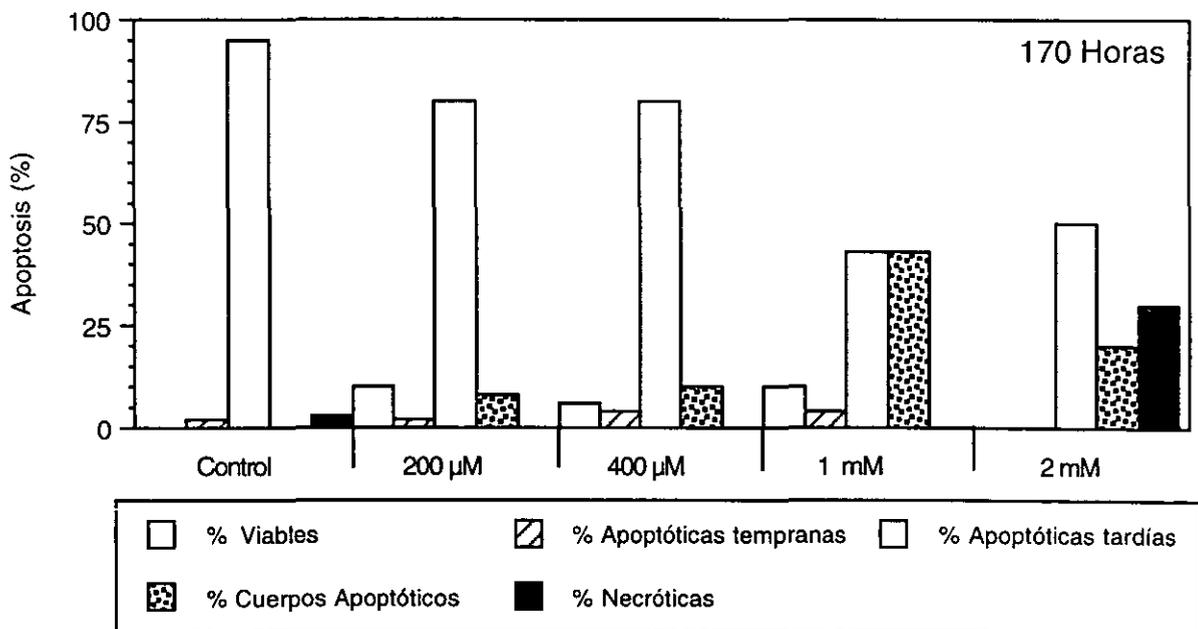


Figura V.21. Efecto de la cisteína sobre la muerte celular a las 170 horas de cultivo. 107

también se observó apoptosis en el cultivo además de necrosis como en todos los cultivos. En la Figura V.21 se muestra que a las 170 h, todavía había células viables (aunque el porcentaje fue menor al 10%) en los cultivos con 0.2, 0.4 y 1 mM de cys, mientras que en el caso del cultivo control solo había células apoptóticas tempranas (menor al 5%). En todos los cultivos la población predominante fue de células apoptóticas tardías. El cultivo con 1 mM de cys fue el que presentó el menor porcentaje de apoptosis total a este tiempo (90%), mientras que el control ya estaba 100% apoptótico. Además, en el cultivo con 2 mM de cys se observó un alto porcentaje de células necróticas (30%), aunque la apoptosis fue el tipo de muerte predominante (70%), corroborándose el resultado del gel. Se ha reportado que la cys se consume por las células de cinco a seis veces más rápido que la cistina (Ohmori y Yamamoto, 1982). Aún cuando la cys y la cistina son transportadas por sistemas diferentes (Bannai, 1984; Bannai y Tateishi, 1986), la velocidad de transporte en general depende del potencial redox y del balance de tioles del medio. Esto es importante ya que en el cultivo de células, la cys se necesita para la síntesis de proteínas y es el precursor limitante en la síntesis de GSH (Bannai y Tateishi, 1986). La cys es transportada principalmente por el sistema ASC en una amplia variedad de células, el cual es dependiente de sodio (Bannai, 1984). Este sistema está sujeto a trans-estimulación y cis-inhibición. Es decir, aún cuando la cisteína extracelular actúa para incrementar la concentración de cisteína interna, existen otros aminoácidos que inhiben competitivamente el flujo de ésta hacia el interior y estimulan su salida. Esto permite mantener una baja concentración intracelular de cisteína (30 a 200 μM), la cual en exceso es tóxica para las células. Este metabolismo de cisteína puede ser la causa de que en nuestro caso, hayamos observado un mayor porcentaje de células viables en el cultivo con respecto al cultivo control, ya que el ambiente del medio era más reductor y por ende, más favorable para las células, evitando que este aminoácido sea limitante para la síntesis de glutatión y de proteínas. Este cambio en el PRC se corroboró al observar que la adición de 1 mM de este aminoácido causó una disminución de -170 mV en el PRC logrando bajar dicho valor hasta -300 mV con 100 mM de cys, sin afectar el pH de medio (Figura V.18). Sin embargo, es necesario verificar si concentraciones tan altas de cys afectan el crecimiento celular a nivel de biorreactor. Este compuesto a diferencia del 2-ME, permanece en forma reducida por mayor tiempo en el medio de cultivo y no se evapora, por lo que el PRC manipulado mediante esta adición puede mantenerse constante por un mayor período de tiempo. También es necesario considerar que el equilibrio se desplaza hacia la forma de cistina y a pH fisiológico de 7.4 el 6% de cys se encuentra ionizado (Torchinskii, 1981).

V.2.5.3. Suero fetal bovino (SFB).

Considerando que el SFB induce la proliferación celular debido en parte a la concentración de agentes reductores que posee (Choi y Jeh, 1988; Glacken *et al.*, 1989), se realizaron cultivos sin SFB y con 10% y 20% de SFB. Los resultados se muestran en la Figura V.22. A las 24 h, y una

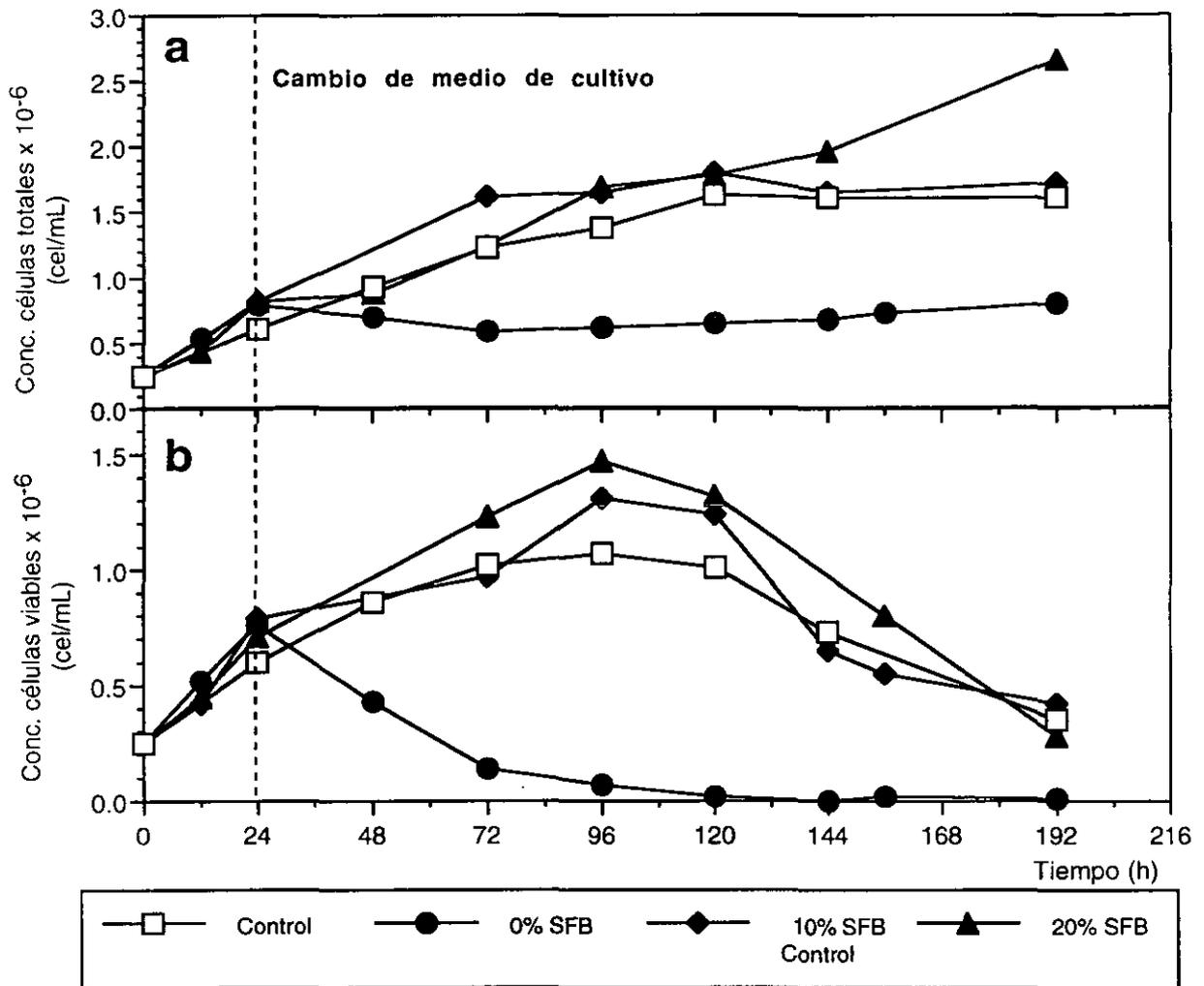


Figura V.22. Efecto de la concentración de suero fetal bovino sobre el crecimiento celular. a) Células totales. b). Células viables.

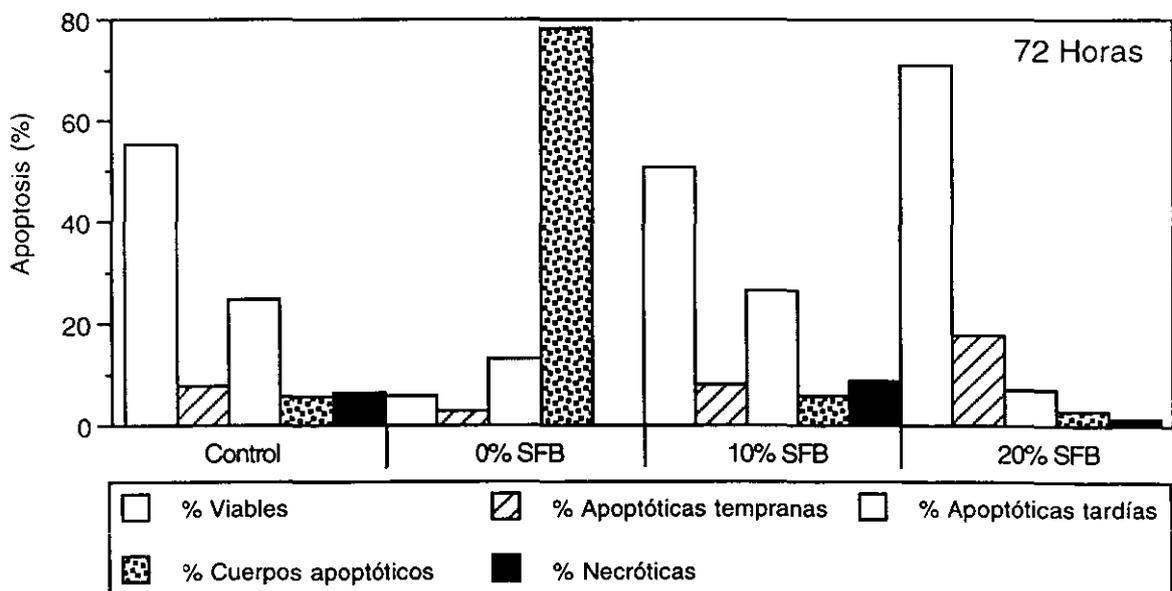


Figura V.23. Efecto del SFB sobre la muerte celular a las 72 h de cultivo.

vez que las células se encontraban en fase exponencial media, se realizó el cambio de medio de cultivo a las condiciones experimentales. Las células sin suplemento de SFB empezaron a morir durante las primeras 24 h (Figura V.22b) observándose una alta población de cuerpos apoptóticos (Figura V.23) a las 72 h de cultivo. El cultivo al 10% de SFB fue una réplica del cultivo control. En el cultivo suplementado con 20% de SFB, se obtuvo mayor concentración celular siendo aproximadamente 20% más de células viables (Figuras V.22a y V.23), aún cuando la velocidad específica de crecimiento aparente fue en promedio similar al control (Figura V.22b). El porcentaje de células apoptóticas tardías (20%) así como de cuerpos apoptóticos (3%) fue mucho menor durante las 72 h primeras de cultivo (Figura V.23), indicando que bajo estas condiciones la muerte celular fue más lenta. En este caso también se observó que el principal tipo de muerte fue la apoptosis (columna 10 de la Figura V.17), aunque para las 170 h no se alcanzó a apreciar el patrón de escalera en el gel. Estos resultados pudieron ser consecuencia tanto de la actividad promotora de crecimiento celular por parte del SFB debido a los factores que éste contiene como de la presencia de compuestos reductores (tales como ditioles) que están involucrados en diferentes procesos metabólicos. En el primer caso, se tenía una mayor concentración de factores de crecimiento en el cultivo suplementado con 20% SFB, por lo que no hubo carencia de éstos como pudo suceder en los cultivos al 10% SFB. Sin embargo, la otra posibilidad es la presencia de ciertos componentes tiólicos que son limitantes en cultivos con baja concentración de suero, los cuales están involucrados con su actividad a nivel celular, con la química de tioles y con el estado redox del medio de cultivo (Glacken *et al.*, 1989). Este último efecto se observa principalmente al inicio de los cultivos, ya que una vez que se incrementa la concentración celular, varias líneas celulares (entre ellas los hibridomas) tienen la capacidad de generar tioles propios (principalmente cisteína) por lo que el requerimiento de compuestos tiólicos disminuye (Hwang y Sinskey, 1991). Este efecto se ha corroborado al cuantificar la concentración de tioles en el SFB al inicio de los cultivos y observar que conforme transcurre el tiempo, la concentración inicial de éstos en el medio a 37 °C disminuye por autooxidación y formación de disulfuros entre ellos mismos. La adición de cys o 2-ME, puede reestablecer dicha actividad, sin que esto suceda cuando se utilizan los disulfuros correspondientes a estos compuestos (Glacken *et al.*, 1989). Por otro lado, el hecho de que las velocidades específicas de consumo de nutrimentos (datos no mostrados) no se vean afectadas, aún cuando se obtenga un mayor número de células, indica que el crecimiento celular tiende a ser más eficiente y esto puede ser debido a que la energía de mantenimiento necesaria para contrarrestar el estrés oxidativo es menor debido a la presencia de los compuestos reductores. La desventaja de la alta concentración de SFB es el alto costo del medio de cultivo que ello implica por lo que es conveniente considerar la estrategia de adición de antioxidantes para evitar la adición de SFB completo.

V.2.5.4. Glutati3n (GSH).

Considerando que el GSH es el principal amortiguador de redox intracelular en todo tipo de c3lulas, se realizaron cultivos suplementados con este compuesto de 0.125 mM a 1.125 mM. Como se muestra en la Figura V.24, no se observ3 una diferencia significativa con respecto al cultivo control en el caso de c3lulas totales (Figura V.24a) ni en el caso de c3lulas viables (Figura V.24b). Sin embargo, la producci3n de AcMo fue ligeramente mayor en los cultivos con adici3n de GSH entre 0.125 y 0.25 mM (Figura V.25). Las velocidades espec3ficas de consumo de nutrientes fueron similares al cultivo control. El nulo efecto sobre el crecimiento celular al adicionar este compuesto, puede ser consecuencia de que el GSH no fue transportado al interior de las c3lulas (Bannai y Tateshi, 1986), por lo que no alter3 el balance redox intracelular. De hecho, se ha reportado que dado el papel fundamental de este compuesto en los mecanismos de defensa, la regulaci3n metab3lica, el plegamiento de prote3nas, la activaci3n celular y la proliferaci3n, existe toda una maquinaria celular encargada de mantener dicho metabolismo, por lo que es dif3cil alterar de forma extracelular su equilibrio (Esposito *et al.*, 1994). Se sabe que la exportaci3n del GSH sirve como un mecanismo para el transporte de amino3cidos as3 como un reductor para los procesos de la superficie celular o para el ambiente inmediato de la c3lula (Meister y Anderson, 1983). Bajo condiciones de estr3s oxidativo en las cuales el glutati3n oxidado se incrementa considerablemente, 3ste es exportado a trav3s de un mecanismo dependiente de ATP para lograr la detoxificaci3n celular (Sies y Akerboom, 1984). Para incrementar la s3ntesis de glutati3n intracelular se han seguido varias estrategias, como son la disponibilidad de sustratos (especialmente de ciste3na como previamente se discuti3), debido a que este amino3cido parece ser el sustrato limitante en la s3ntesis de GSH. Debido a la toxicidad de este compuesto, se han empleado tambi3n derivados de ciste3na en los que el grupo SH es enmascarado y transportado dentro de las c3lulas para ser convertido r3pidamente a ciste3na ya en el interior de 3stas (Anderson y Meister, 1987). Tambi3n, se han utilizado mono3steres de GSH para incrementar su s3ntesis (Meister, 1988).

Adem3s, el GSH adicionado no tuvo un efecto relevante en el PRC del medio (Figura V.18) pero s3 sobre la disminuci3n de pH. Esto puede ser consecuencia de que el equilibrio de la reacci3n a pH fisiol3gico (al cual se realiz3 este experimento) pudo ocasionar que inmediatamente el compuesto se oxidara y formara el disulfuro, sin tener efecto sobre el medio de cultivo. Esto puede ser corroborado si se considera que a pH de 7.4 solamente 1% del GSH se encuentra ionizado (Torchinskii, 1981).

V.2.5.4. Per3xido de hidr3geno (H₂O₂).

Por 3ltimo, se realizaron cultivos a los que se les adicion3 0.1 mM de H₂O₂. Los resultados se muestran en la Figura V.26. Como se observa, el efecto de este compuesto es letal sobre las c3lulas

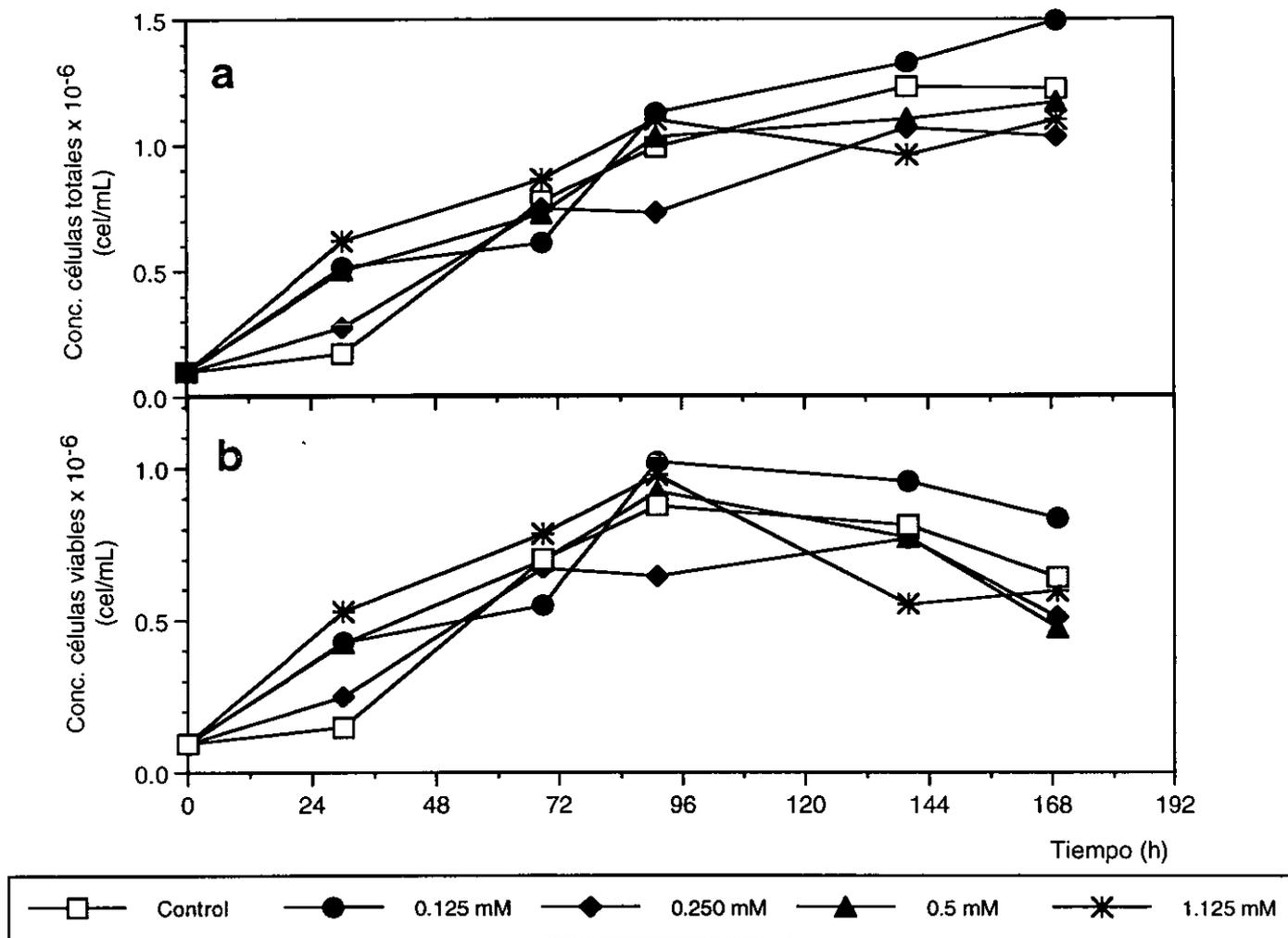


Figura V.24. Efecto de la adición de glutatión sobre el crecimiento celular. a) Células totales. b) Células viables.

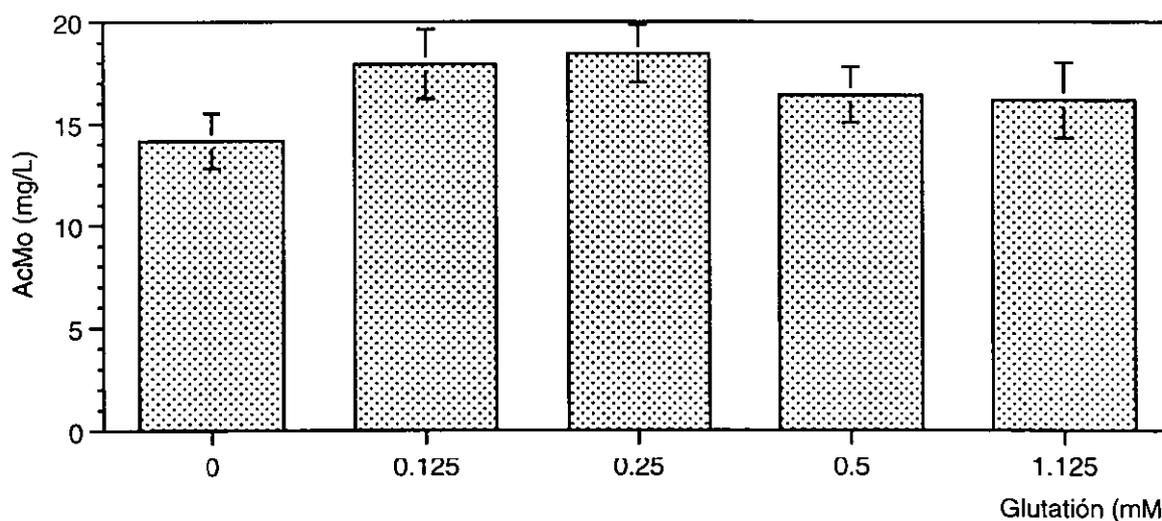


Figura V.25. Efecto de la adición de glutatión sobre la producción de anticuerpo monoclonal.

ya que dicha concentración causó una disminución en la viabilidad celular. Por ello, es necesario considerar concentraciones más bajas para poder modificar el PRC. Considerando que el tamaño celular puede utilizarse como indicativo del tipo de muerte (Meneses *et al.*, 2001), se observa que este cultivo murió por apoptosis (Figura V.27). Existen reportes en los cuales se ha observado que el estrés oxidativo es un causante de apoptosis (Basaga, 1990; Lord-Fontaine y Averill, 1999). Sin embargo, también se ha reportado que este tipo de compuestos puede utilizarse en procesos de señalización y diferenciación celular (Finkel, 1998), sugiriendo que las ROS también tienen funciones positivas en las células.

La adición del H_2O_2 puede utilizarse para manipular el PRC ya que 0.1 M de peróxido causó un cambio de +200 mV, sin modificar el pH (Figura V.18), valor que es 100 mV más alto a aquel alcanzado por variaciones en el OD, pero es necesario considerar concentraciones más bajas de este compuesto dado el efecto negativo que tiene.

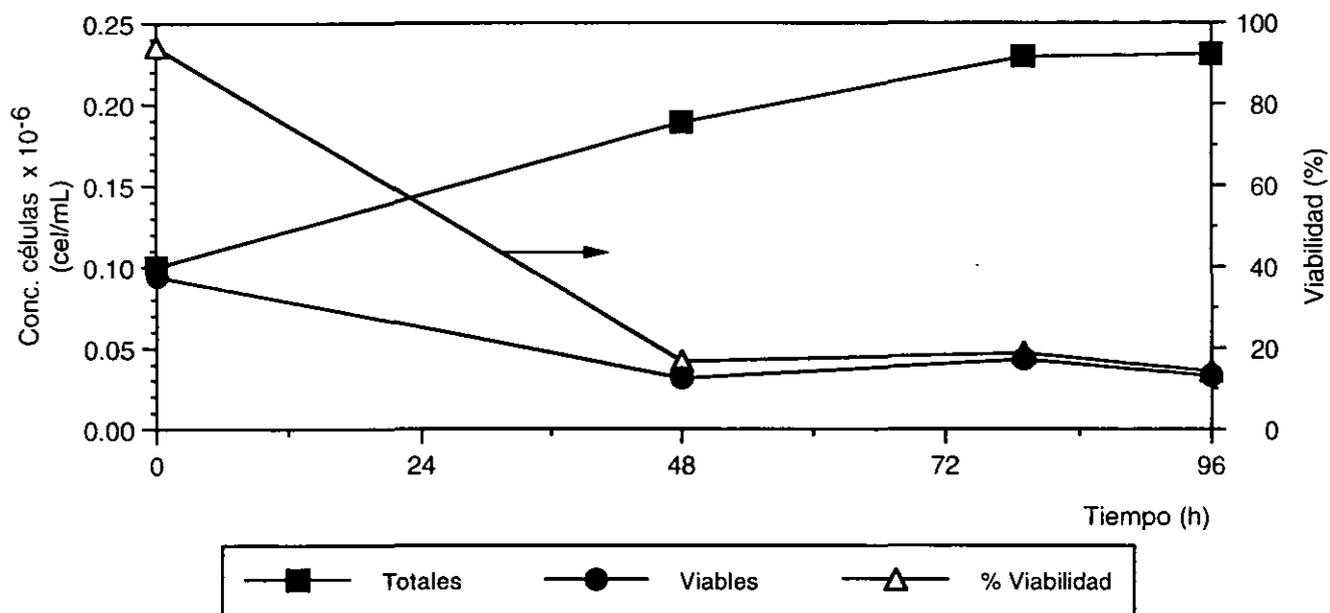


Figura V.26. Efecto de la adición de 0.1 mM de peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento celular.

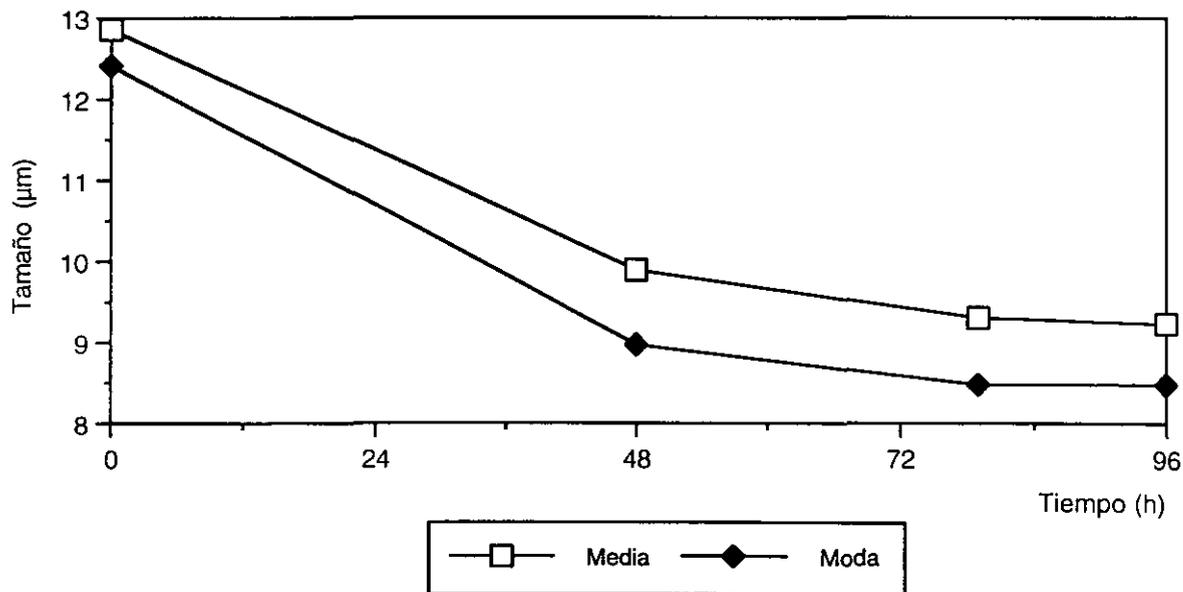


Figura V.27. Efecto de la adición de 0.1 mM de peróxido de hidrógeno sobre el tamaño celular.

VI. Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo pueden dividirse en dos rubros. Por un lado aquellas referentes a la caracterización de las líneas celulares y por otro, las obtenidas con el control del potencial redox del cultivo.

Con respecto a la caracterización celular, se determinó que para los hibridomas murinos BCF2 el carbohidrato principalmente utilizado es la glucosa generándose una alta cantidad de lactato como resultado del metabolismo celular. La sustitución de este carbohidrato por fructosa no fue factible debido a que se afectó de manera importante el crecimiento celular. Dado que no fue posible disminuir la concentración de lactato generado en el cultivo mediante el uso de fuentes alternativas de carbono, la estrategia para evitar la acidificación del medio de cultivo fue incrementar la capacidad amortiguadora de éste aumentando la concentración de bicarbonato de sodio de 2.2 g/L a 3.7 g/L, lo cual no afectó ni la osmolaridad ni el crecimiento celular.

La caracterización de la muerte en hibridomas y células de insecto Sf9 permitió concluir que en la primera línea, la muerte predominante es la apoptótica típica presentando características tales como pérdida de forma y disminución de tamaño celular, fragmentación nuclear, fragmentación específica de ADN, condensación de cromatina asociada a la región perinuclear, hinchamiento del retículo endoplásmico, mitocondrias intactas y formación de cuerpos apoptóticos (con y sin cromatina). Mientras que en células de insecto Sf9, se identificó un patrón mixto de muerte con características tanto apoptóticas como necróticas. Las características apoptóticas abarcaron pérdida de tamaño celular y forma, condensación parcial de cromatina, hinchamiento del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi. Las características necróticas fueron degradación inespecífica de ADN, hinchamiento de mitocondrias, integridad del núcleo aún en etapas muy tardías de muerte y la poca asociación de la cromatina a las paredes de la envoltura nuclear. Además, se identificaron algunas características particulares de las células de insecto viables tales como la presencia de una población uninucleada y otra polinucleada; la tetraploidía en el contenido de ADN independientemente de la cantidad de núcleos de la célula; y el proceso de fagocitosis activa (proceso reportado por primera vez *in vitro*). Estas características también permitieron demostrar la utilidad del tamaño celular para identificar el inicio de la muerte en

ambos cultivos. Por un lado, para células de insecto Sf9, la aparición de una segunda población de menor tamaño fue indicativo de que el cultivo empieza a morir, mientras que en el caso de los hibridomas, la disminución de tamaño por debajo de un 10% al tamaño máximo indicó el inicio de la muerte del cultivo.

La caracterización de hibridomas transfectados con el gene antiapoptótico *bcl-2*, permitió concluir que la expresión de este gene permite incrementar el tiempo de vida del cultivo por lo cual es una buena estrategia para incrementar las productividades del sistema. Además, las células transfectadas murieron principalmente por necrosis aunque la apoptosis también se manifestó. Considerando que algunas rutas de señalización involucradas para el desencadenamiento de la muerte apoptótica son dependientes del potencial redox intracelular, es posible que la manipulación del PRC junto con la manipulación genética de dichas rutas permitan incrementar las productividades de los cultivos celulares de manera importante.

Por último, se consideró que la presencia del retrovirus endógeno clasificado como partículas tipo-A ó tipo-C en el hibridoma BCF2 no afectó los resultados generados ya que dichas partículas provienen de los progenitores de este hibridoma (tanto mieloides como linfoides) por lo que la caracterización que se ha realizado de esta línea celular siempre ha involucrado a tales partículas. Sin embargo, es necesario hacer notar que la presencia de este tipo de partículas limita la aplicación de los AcMo's a nivel terapéutico, por lo que se recomienda realizar microscopías electrónicas, así como pruebas de diagnóstico (como la de la transcriptasa inversa) de cada una de las líneas celulares utilizadas para este fin.

Dentro de la manipulación del PRC por medio del OD se desarrolló un programa de control de tipo proporcional que permitió mantener el PRC en un 95% de exactitud y precisión con respecto al valor preestablecido. Este control se hizo sobre una variable con comportamiento logarítmico dada la dependencia del OD con el PRC, de acuerdo con la ecuación de Nernst. Hasta donde sabemos, es la primera vez que se ha reportado a nivel mundial un control de este tipo. Dicho comportamiento se puso de manifiesto en las ganancias del sistema ya que en el caso de cultivos oxidantes éstas se incrementaron aproximadamente 30 veces con respecto a los valores reductores para poder mantener el PRC en valores constantes y predeterminados. Además, el

programa de control utilizado para tal fin se hizo más versátil y didáctico permitiendo al usuario un mejor entendimiento del mismo. La dependencia de la ordenada al origen en la lectura del electrodo se corrigió ante la observación de que todos los electrodos utilizados presentaron pendientes iguales (PRC vs. OD) por lo que se tomó como valor inicial (cero mV), aquel obtenido a 50% OD, pH 7.2, 37 °C y 150 rpm. Se consideraron cultivos reductores a aquellos en los que el PRC fue negativo con respecto al valor inicial y oxidantes a aquellos en los que el valor del PRC fue positivo con respecto al valor inicial.

El comportamiento del PRC en cultivos a OD constante permitió concluir que la relación obtenida entre el PRC y el número de células viables/mL es dependiente de la concentración de OD, por lo que si se quiere utilizar el PRC como indicativo del crecimiento celular, es necesario hacer la curva de calibración con la línea celular en particular y bajo la condición de OD a trabajar. Sin embargo, este comportamiento del PRC permite monitorear en línea un parámetro crítico (el crecimiento) en los cultivos celulares.

Una vez establecido el control del redox, el análisis de las diferentes cinéticas realizadas demostró que valores de PRC muy reductores (-133 mV) promueven el crecimiento celular y por tanto, la producción de AcMo, aún cuando la velocidad específica de crecimiento no se afecta y la velocidad específica de producción de AcMo disminuye a valores muy reductores y oxidantes, encontrando un óptimo a cero mV aproximadamente. Esto parece indicar que la célula necesita estar bajo cierto tipo de estrés para incrementar la velocidad específica de producción de AcMo. Los metabolismos de glucosa, oxígeno y glutamina no se ven afectados en valores reductores y ligeramente oxidantes; sin embargo, en cultivos altamente oxidantes se presentó un aumento en los consumos de nutrimentos. Esto puede ser consecuencia de que a valores oxidantes, la célula debe mantener un equilibrio para compensar el alto estrés oxidativo al que está sometida. La concentración de tioles generados en el medio de cultivo se incrementó conforme el PRC disminuyó, aunque su velocidad específica de producción no se afectó significativamente. Se demostró que en condiciones altamente oxidantes, se desencadena la muerte apoptótica prematura, aún en presencia de los nutrimentos esenciales como son SFB, glucosa y glutamina. Al obtener bajo condiciones reductoras mayor concentración celular con las mismas velocidades de consumo de nutrimentos, se concluye que dichas condiciones favorecen el crecimiento celular

incrementando los rendimientos celulares respecto a los diferentes nutrientes. Sin embargo, al necesitar cierto grado de estrés para producir el AcMo, es necesario que dichas condiciones cambien a valores más oxidantes. Con ello, es posible establecer una estrategia de operación en la que inicialmente el PRC se mantenga en valores reductores (para promover el crecimiento celular hasta alcanzar una alta concentración en el cultivo por lote), y, posteriormente, cambiar el PRC hacia valores más oxidantes para promover la producción de AcMo, sin afectar el consumo de nutrientes. Dicha estrategia permitiría obtener mayor concentración de AcMo. Otra estrategia puede ser el uso de cultivos por lote alimentado o continuos para inhibir la muerte apoptótica, adicionando los nutrientes indispensables y promover el crecimiento celular manteniendo el PRC en el valor óptimo para obtener la máxima velocidad de producción de AcMo.

Otra alternativa de manipulación del PRC es la adición de antioxidantes. Los antioxidantes que pueden ayudar a mantener el PRC en valores constantes y predeterminados, pueden ser el 2-mercaptoetanol y la cisteína, debido a los cambios que propiciaron en el PRC. El glutatión no permitió cambios en el PRC, aún cuando es el principal componente redox intracelular, por lo que se descartó la posibilidad de ser empleado como compuesto para manipular el PRC. Asimismo, el uso del SFB no permitió manipular el PRC pero sí incrementó los costos del cultivo por lo que también quedó descartado. Por otro lado, el uso de oxidantes causa muerte celular por lo que si se quiere manipular el PRC a valores más positivos, es necesario medir la influencia de estos compuestos a menores concentraciones.

VII. Perspectivas

Como perspectivas de este trabajo quedan varios puntos por cubrir para profundizar en la caracterización de sistemas en los que se controle el PRC. Por un lado, se recomienda realizar la caracterización cinética en cultivos en los que se controle el PRC por medio de cambios en el pH y en los que se mantenga el OD constante al igual que el PRC. Estos cambios deberán realizarse en un intervalo de pH de 6.5 a 7.5 para evitar el daño celular. El programa de control ya se ha desarrollado por lo que es necesario solamente verificar la afinación del mismo a través del cálculo de ganancias.

Por otro lado, es posible adaptar la adición de antioxidantes al control del redox en el reactor. Con los resultados reportados anteriormente, el 2-mercaptoetanol y la cisteína parecen ser buenos candidatos. Esta adición de antioxidantes al medio de cultivo para controlar el PRC puede permitir mantener el OD, el pH y el PRC en valores constantes y predeterminados por lo que los resultados obtenidos podrán corroborar el efecto del control de PRC eliminando la influencia por parte del OD y del pH.

También puede establecerse el efecto del control del PRC sobre líneas que no presenten apoptosis como la que se caracterizó con el gene antiapoptótico *bcl-2*. Esto permitirá observar si las condiciones oxido-reductoras afectan la productividad de este tipo de líneas en las que según evidencias está involucrado el potencial redox a nivel intracelular. Además puede probarse el efecto de este control en la expresión y glicosilación de proteínas (ya sea propias o recombinantes) en otro tipo de líneas celulares animales. Asimismo, es posible extender la aplicación de este control a otro tipo de sistemas de producción como son las células de insecto-baculovirus, con la finalidad de establecer si es posible optimizar la producción de proteínas recombinantes. También podrían tener potencial en procesos de fermentación microbiana para optimizar el plegamiento de proteínas, proceso limitante para la obtención de proteínas biológicamente activas a partir de cuerpos de inclusión creados en bacterias recombinantes, o extender su uso en otros procesos biotecnológicos como es el área de biorremediación o en las fermentaciones microbianas, en donde dicho parámetro ya empieza a tener aplicaciones importantes. El mantenimiento del PRC en valores constantes y predeterminados puede permitir conocer el balance redox intracelular, por lo que otra perspectiva puede ser el estudio de los

flujos intracelulares redox para el mejoramiento de las productividades del proceso. Esto puede ser posible por la dependencia del potencial redox intracelular con su ambiente y por el balance redox que se presenta en la célula para optimizar sus funciones de crecimiento, reproducción, producción y metabolismo.

Otras aplicaciones más generales involucran el control del PRC en el plegamiento de proteínas *in vitro*, con la finalidad de optimizar este punto crítico que se presenta en la producción de proteínas recombinantes. Este aspecto, a diferencia de las aplicaciones en el área de biorremediación y de fermentaciones microbianas ha sido poco estudiado ya que a la fecha todavía dichos procesos se basan en relaciones empíricas de mezclas de amortiguadores de redox para realizar el plegamiento de proteínas.

VIII. Referencias

- Aguilar-Aguila A., Valentinotti S., Galindo E., Ramírez O.T. (1993). Desarrollo de un sistema amigable y versátil para adquisición de datos y control de bioreactores. *Biotecnología*, 3: S130-S139.
- Ahmad M., Srinivasula S.M., Wang L., Litwack G., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. (1997). *Spodoptera frugiperda* caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 1421 – 1424.
- Akashi K., Ikeda S., Shibal H., Kobayashi K., Hirose Y. (1977). Determination of redox potential levels critical for cell respiration and suitable for L-leucine production. *Biotechnology and Bioengineering*, 20: 27-42.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1994). *Molecular biology of the cell*, 3rd ed. New York: Y. Garland. pp. 958-966.
- Al-Rubeai M. (1998). Apoptosis and cell culture technology. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 59: 225-249.
- Al-Rubeai M., Mills M., Emery A.N. (1990). Electron microscopy of hybridoma cells with special regard to monoclonal antibody production. *Cytotechnology*, 4: 13 – 28.
- Al-Rubeai M., Emery A.N., Chalder S. (1991). Flow cytometric study of cultured mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 19: 67-82.
- Al-Rubeai M., Singh R.P., Goldman M.H., Emery A.N. (1995a). Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 45: 463-472.
- Al-Rubeai M., Singh R.P., Emery A.N., Zhang Z. (1995b). Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces. *Biotechnology and Bioengineering*, 46: 88-92.
- Al-Rubeai M., Simpson H. N., Milner A.E. (1997). Prevention of hybridoma cell death by Bcl-2 during sub-optimal culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 54: 1-16.
- Allen R.G., Tresini M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 28 (3): 463-499.
- Anderson M.E., Meister A. (1987). Intracellular delivery of cysteine. *Methods of Enzymology*, 143: 313-325.
- Bains J.S., Shaw C.A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*, 25:335-358.
- Bandyopadhyay R.S., Phelan M., Faller D.V. (1995). Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. *Biochimica et Biophysica Acta (Gene structure and expression)*, 1264: 72-78.
- Bannai S. (1984). Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 779: 289-306.

- Bannai S., Tateishi N. (1986). Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *Journal of Membrane Biology*, 89: 1-8.
- Bannai S., Sato H., Ishii T., Sugita Y. (1989). Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 18480-18484.
- Bardwell J.C.A., Lee J.O., Jander G., Martin N., Belin D., Beckwith J. (1993). A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 90: 1038-1042.
- Barr P.J., Tomel L.D. (1994). Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technology*, 12: 487-493.
- Basaga H.S. (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry of Cellular Biology*, 68: 989-998.
- Berovic M. (1999). Scale-up of citric acid fermentation by redox potential control. *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 552-557.
- Berovic M., Cimerman A. (1979). Foaming in submerged citric acid fermentation on beet molasses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 7: 313-319.
- Berovic M., Cimerman A. (1982). Redox potential in submerged citric acid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 16: 185-188.
- Bespalov V.A., Zhulin I.B., Taylor B.L. (1996). Behavioral responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. *Proceedings of the National Academic of Sciences, U.S.A.* 93: 10084-10089.
- Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Amaldi, P.P., Cattaneo, A. (1995). Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria. *Bio/Technology*, 13: 1110-1115.
- Birch JR. (2000). Cell products: antibodies. In Spier RE, editor. *Encyclopedia of Cell Technology*. Vol I. Ed. John Wiley & Sons Inc., New York., pp. 411-423.
- Bonarius, H.P.J., Houtman, J.H.M., Schmid, G., De Gooijer, C.D., Tramper, J. (2000). Metabolic-flux analysis of hybridoma cells under oxidative and reductive stress using mass balances. *Cytotechnology*, 32: 97-107.
- Bühler H., Bucher, R. (1982). Redox measurement. Principles and Problems. *GIT Fachz. Lab.* 26: 839. *Catálogo Ingold*.
- Bursch W., Kleine L., Tenniswood M. (1990). The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochemistry of Cellular Biology*, 68: 1071-1074.
- Buttke T.M., Sandstrom P.A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*, 15: 7-10.
- Cacciuttolo M.A., Patchan M., Palmer H.F., Tsao E.I. (1996). On-line monitoring techniques for the optimization of the production of virus-like particles in Hi-5 insect cells. *Abstracts Papers of the American Chemical Society, 211 Meet. Pt. 1.BIOT146*.

- Cadenas E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Reviews of Biochemistry*, 58: 79-110.
- Carelli S., Ceriotti A., Cabibbo A., Fassina G., Ruvo M., Sitia R. (1997). Cysteine and glutathione secretion in response to protein disulfide bond formation in the ER. *Science*, 277: 1681-1684.
- Chautan M., Chazal G., Cecconi F., Gruss P., Golstein P. (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Current Biology*, 9: 967 – 970.
- Chernyak B.V. (1997). Redox regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Bioscience Reports*, 17: 293-302.
- Choi C., Jeh H. (1988). Development of low-serum medium for the large scale culture of mouse X mouse hybridoma. . Abstracts Papers American Chemical Society, Meet., MBTB124.
- Clem R.J., Fechheimer M., Miller L.K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 254: 1388-1389.
- Coffin J.M. (1996). *Retroviridae: The viruses and their replication*. Third Ed. BN Fields DM Knioe, PM Howler et al. (eds.). Lipincot, Raun Publishers, Philadelphia. pp. 1767-1782.
- Cohen G.M., Sun X.M., Snowden R.T., Dinsdale D., Skilleter D.N. (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochemical Journal*, 286: 331-334.
- Coligan J., Krulsbeek A. M., Marguiles D.H. (1994). Related isolation procedures and functional assays. Morphological, biochemical and flow cytometric assays of apoptosis. *Current Protocols of Immunology*. John Wiley and Sons Inc. USA, supplement 16 CPI.
- Collins R.J., Harmon B.V., Gobé G.C., Kerr J.F.R. (1992). Internucleosomal DNA cleavage should not be used as the sole criterion for identifying apoptosis. *International Journal of Radiation Biology*, 61: 451-453.
- Cotter T.G., Al-Rubeai M. (1995). Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *Trends in Biotechnology*, 13: 150-155.
- Cowger N.L., O'Connor K.C., Bivins J.E. (1997). Influence of simulated microgravity on the longevity of insect-cell culture. *Enzyme Microbial Technology*, 20: 326-332.
- Cowger N.L., O'Connor K.C., Hammond T.G., Lacks D.J., Navar G.L. (1999). Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating-wall vessel and shaker flask. *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 14-26.
- Cross P.C., Mercer K.L. (1993). *Cell and tissue ultrastructure, a functional perspective*. Freeman and Company. New York, pp. 2- 42.
- Dahod S.K. (1982). Redox potential as a better substitute for dissolved oxygen in fermentation process control. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 55 – 56.
- Daniels W.F., Garcia L.H., Rosensteel J.F. (1970a). The relationship of oxidation-reduction potential to the growth performance of tissue culture media poised prior to incubation. *Biotechnology and Bioengineering*, 12: 409-417.

- Daniels W.F., Garcia L.H., Rosensteel, J.F. (1970b). Oxidation-reduction potential and concomitant growth patterns of cultures of Earle's "L" cells in centrifuge bottle spinners. *Biotechnology and Bioengineering*, 12: 419-428.
- Daniels W.F., Parker D.A., Johnson R.W., Schneider, L.E. (1965). Controlled pH and oxidation-reduction potential with a new glass tissue culture fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 7: 529-553.
- De León A. (1999). Cultivo de células hematopoyéticas humanas suspendidas en reactores instrumentados: utilidad de la velocidad de consumo de oxígeno y el potencial redox. Tesis de Doctorado en Biotecnología. IBT-UNAM, pp. 81.
- Doong R.A., Wu S.C. (1992). The effect of oxidation-reduction potential on the biotransformations of chlorinated hydrocarbons. *Water Science and Technology*, 26: 159-168.
- Duke R.C., Cohen J.J. (1995). Morphological, biochemical and flow cytometric assays of apoptosis. In: Janssen K. (ed.). *Current protocols in immunology*: John Wiley & Sons. New York, pp. 3.17.1-33.
- Duncan R., Muller J., Lee N., Esmaili A., Nakhasi H.L. (1999). Rubella virus-induced apoptosis varies among cell lines and is modulated by Bcl-X_L and caspase inhibitors. *Virology*, 255: 117-128.
- Edington S.M. (1993). Looking death in the eye: apoptosis and cancer research. *Bio/Technology*, 11: 787-792.
- Ellman G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77.
- Esposito F., Agosti V., Morrone G., Morra F., Cuomo C., Russo T., Venuta S., Cimino F. (1994). Inhibition of the differentiation of human myeloid cell lines by redox changes induced by glutathione depletion. *Biochemistry Journal*, 301: 649-653.
- Eyer K., Heinzle E. (1996). On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 277-283.
- Fassnacht D., Rossing S., Ghaussy N., Pörtner R. (1997). Influence of non-essential amino acids on apoptotic and necrotic death of mouse hybridoma cells in batch cultures. *Biotechnology Letters*, 19: 35-38.
- Fassnacht, D., Rössing, S., Franek, F., Al-Rubeai, M., Pörtner, R. (1998). Effect of Bcl-2 expression on hybridoma cell growth in serum-supplemented, protein-free and diluted media. *Cytotechnology*, 26: 219-225.
- Fassnacht D., Rössing S., Singh R.P., Al-Rubeai M., Pörtner R. (1999). Influence of bcl-2 on antibody productivity in high cell density perfusion cultures of hybridoma. *Cytotechnology*, 30: 95-105.
- Fernandez A., Kiefer J., Fosdick L., McConkey, D.J. (1995). Oxygen radical production and thiol depletion are required for Ca²⁺-mediated endogenous endonuclease activation in apoptotic thymocytes. *Journal of Immunology*, 155: 5133-5139.

- Fertig G., Klöppinger M., Miltenburger H.G. (1990). Cell cycle kinetics of insect cell cultures compared to mammalian cell cultures. *Experimental Cell Research*, 189: 208-212.
- Finkel T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 10: 248-253.
- Fontaine S.L., Averill, D.A. (1999). Enhancement of cytotoxicity of hydrogen peroxide by hyperthermia in Chinese hamster ovary cells: role of antioxidant defenses. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 363: 283-295.
- Franèk F., Vomastek T., Dolníková J. (1992). Fragmented DNA and apoptotic bodies document the programmed way of cell death in hybridoma cultures. *Cytotechnology*, 9: 117-123.
- Galazka F.J., Freidman A. (1997). Controversies about iron in parkinsonian and control substantia nigra. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 57: 217-225.
- Gill R.T., Cha J., Jain A., Rao G., Bentley W.E. (1998). Generating controlled reducing environments in aerobic recombinant *Escherichia coli* fermentations: Effects on cell growth, oxygen uptake, heat shock protein expression, and in vivo CAT activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 59: 248-259.
- Glacken M.W. Adema E., Sinskey J. (1989). Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics: II. The relationship between thiol chemistry and the degradation of serum activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 440-450.
- Goel A., Lee J., Domach M.M., Atai M.M. (1999). Metabolic fluxes, pools, and enzyme measurements suggest a tighter coupling of energetics and biosynthetic reactions associated with reduced pyruvate kinase flux. *Biotechnology and Bioengineering*, 129: 629-640.
- Goswami J., Sinskey A.J., Steller H., Stephanopoulos G.N., Wang D.I.C. (1999). Apoptosis in batch cultures of chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 62: 632-640.
- Griffiths B. (1984). The use of oxidation-reduction potential (ORP) to monitor growth during a cell culture. *Developmental Biology Standard*, 55: 113 – 116.
- Graindorge P., Charbonnier S., Magnin J.P., Mauvy C., Cheruy A. (1994). A software sensor of biological activity based on a redox probe for the control of *Thiobacillus ferrooxidans* cultures. *Journal of Biotechnology*, 35: 87-96.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1985). Free radicals in biology and medicine. Oxford Science, Oxford, pp 34-35.
- Hammarqvist F., Luo J.L., Cotgreave I.A., Andersson K., Wernerman J. (1997). Skeletal muscle glutathione is depleted in critically ill patients. *Critical Care Medicine*, 25: 78-84.
- Hampton M.B., Orrenius S. (1998). Redox regulation of apoptotic cell death in the immune system. *Toxicology Letters*, 102-103: 355-358.
- Hansson M., Asea A., Ersson U. (1996). Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *Journal of Immunology*, 156: 42-47.
- Hart B.A., Lee C.H., Shukla G.S., Shukla A., Osier M., Eneman J.D., Chiu J.F. (1999). Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology*, 133: 43-58.

- Harrison D.E.F. (1972). Physiological effects of dissolved oxygen tension and redox potential on growing populations of micro-organisms. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, 22: 417 – 440.
- Harvey P.I., Crundwell F.K. (1997). Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*: a novel experimental design for batch growth and bacterial leaching studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2586-2592.
- Hashimoto Y., Ono T., Goto M., Hatton T.A. (1998). Protein refolding by reversed micelles utilizing solid-liquid extraction technique. *Biotechnology and Bioengineering*, 57: 620-623.
- Higareda A.E., Possani L.D., Ramírez O.T. (1997). The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 56: 555-563.
- Hill R. (1973). A note of some old and some possible new redox indicators. *Bioenergetics*, 4: 229-237.
- Hirsch T., Marchetti P., Susin S.A., Dallaporta B., Zamzami N., Marzo I., Geuskens M., Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15: 1573-1581.
- Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Millman C.L. Korsmeyer S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75: 241-251.
- Holst B., Tachibana C., Winther J.R. (1997). Active site mutations in yeast protein disulfide isomerase cause dithiothreitol sensitivity and a reduced rate of protein folding in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 138: 1229-1238.
- Huth, J.R., Feng, W., Ruddon, R.W. (1994). Redox conditions for stimulation of *in vitro* folding and assembly of the glycoprotein hormone chorionic gonadotropin. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 66-72.
- Hwang Ch., Sinskey A.J. (1991). The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells. In Spier, R.E., Griffiths, J.B., and Meignier, (eds.), *Production of biologicals from animal cells in culture*. B. Halley Court, Oxford, pp 548 – 567.
- Hwang Ch., Lodish H.F., Sinskey A.J. (1992). Measurement of glutathione redox state in cytosol and secretory pathway of cultured cells. *Methods in Enzymology*, 251: 212-220.
- Irani N., Wirth M., Van de Heuvel J., Wagner R. (1999). Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 66: 238-246.
- Ishii T., Bannai S., Bannai S., Sugita Y. (1981a). Mechanism of growth stimulation of L1210 Cells by 2-mercaptoethanol *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 256: 12387-12392.
- Ishii T., Hishinuma I., Sugita Y. (1981b). Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L1210 cells *in vitro* by feeder layer or 2-mercaptoethanol. *Journal of Cellular Physiology*, 107: 283-293.

- Itoh Y., Ueda H., Suzuki E. (1995). Overexpression of Bcl-2, apoptosis suppressing gene: prolonged viable culture period of hybridoma and enhanced antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 48: 118-122.
- Jacobi A., Wunderlich M.H., Hennecke J., Glockshuber, R. (1997). Elimination of all charged residues in the vicinity of the active-site helix of the disulfide oxidoreductase DsbA. *Journal Biological Chemistry*, 272: 21692-21699.
- Jacobson M.D., Raff M.C. (1995). Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature*, 374: 814-816.
- Jacobson M.D. (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends in Biological Sciences*, 21: 83-86.
- Jurma O.P., Hom D.G., Andersen J.K. (1997). Decreased glutathione results in calcium-mediated cell death in PC12. *Free Radical Biology and Medicine*, 23: 1055-1066.
- Kaake R.H., Roberts D.J., Stevens T.O., Crawford R.L., Crawford D.L. (1992). Bioremediation of soils contaminated with the herbicide 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (Dinoseb). *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1683-1689.
- Kaake R.H., Crawford D.L., Crawford R.L. (1995). Biodegradation of the nitroaromatic herbicide dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol) under reducing conditions. *Biodegradation*, 6: 329-337.
- Kane D.J., Sarafian T.A., Anton R. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 262: 1274-1276.
- Kaplan A. (1965). Urea, nitrogen and urinary ammonia. *Standard Methods of Clinical Chemistry*, 5: 245 – 256.
- Kemmink J., Darby N.J., Dijkstra K., Nilges M., Creighton T.E. (1997). The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Current Biology*, 7: 239-245.
- Kitanaka C., Kuchino Y. (1999). Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differentiation*, 6: 508- 515.
- Kjaergaard L. (1977). The redox potential: its use and control in biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering*, 7: 131-150.
- Kjaergaard L., Joergensen B.B. (1979). Redox potential as a state variable in fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering Symposium Series*, 9: 85-94.
- Knepp V.M., Whatley J.L., Muchnik A., Calderwood, T.S. (1996). Identification of antioxidants for prevention of peroxide-mediated oxidation of recombinant human ciliary neurotrophic factor and recombinant human nerve growth factor. *Research*, 50: 163-171.
- Krauter P., Martinelli R., Williams K., Martins S. (1996). Removal of Cr(VI) from groundwater by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biodegradation*, 7: 277-286.
- Kuff E.L., Lueders K.K. (1988). The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Advances in Cancer Research*, 51: 183-276.

- Kuno H., Ikeda H., Takeuchi M., Yoshida T. (1999). A simple and rapid reverse transcriptase assay for the detection of retroviruses in cell cultures. *Cytotechnology*, 29: 221-227.
- Kwong C.W., Rao G. (1991). Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 38: 1034-1040.
- Kwong S.C.W., Rao G. (1992). Effect of reducing agents in an aerobic amino acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 40: 851-857.
- Léry X., Charpentier G., Belloncik S. (1999). DNA content analysis of insect cell lines by flow cytometry. *Cytotechnology*, 29: 103-113.
- Lee T.H., Chang Y.K., Chung B.H., Park Y.H. (1998). Correlation of redox potential with state variables in cultures under controlled dissolved oxygen concentration and pH. *Biotechnology Progress*, 14: 959-962.
- Lipton S.A., Choi Y.B., Pan Z.H., Lei S.Z., Chen H.S.V., Sucher N.J., Loscalzo J., Singel D.J., Stamler J.S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364: 626-632.
- Liu S.M., Jones W.J., Rogers J.E. (1994). Influence of redox potential on the anaerobic biotransformation of nitrogen-heterocyclic in anoxic freshwater sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41: 717-724.
- Ljung J., Holmgren A., Aslund F. (1996). Preparation of correctly branched proteins containing disulfide linkages, used to make drugs based on human proteins. Patent. SE 9501285; 07.10.96
- Lloyd J.R., Thomas G.H., Finlay J.A., Cole J.A., Macaskie, L.E. (1999). Microbial reduction of technetium by *Escherichia coli* and *Desulfovibrio desulfuricans*: Enhancement via the use of high-activity strains and effect of process parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, 66: 122-130.
- Lord-Fontaine S., Averill D.A. (1999). Enhancement of cytotoxicity of hydrogen peroxide by hyperthermia in Chinese hamster ovary cells: role of antioxidant defenses. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 363: 283 - 295.
- Lorenson M.Y., Jacobs L.S. (1982). Thiol regulation of protein, growth hormone, and prolactin release from isolated adenohipophysial secretory granules. *Endocrinology*, 110: 1164-1172.
- Luan Y.T., Mutharasan R., Magee W.E. (1987). Strategies to extend longevity of hybridomas in cultures and promote yield of monoclonal antibodies. *Biotechnology Letters*, 9: 691-696.
- Lyon M., Huppert, J. (1983). Depression of reverse transcriptase activity by hybridoma supernatants: a potential problem in screening for retroviral contamination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 112: 265-272.
- Madeo F., Fröhlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S.J., Wolf D.H., Fröhlich K.U. (1999). Oxygen stress: A regulator of apoptosis. *Journal of Cellular Biology*, 145: 757-767.
- Malhotra R., Brosius III, F.C. (1999). Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 12567-12575.

- Marchetti P., Decaudin D., Macho A., Zamzami N., Hirsch T., Susin S.A., Kröemer G. (1997). Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *European Journal of Immunology*, 27: 289-296.
- Mariani M., Tarditi L. (1992). Validating the preparation of clinical monoclonal antibodies. *Bio/Technology*, 10: 394-396.
- Martau T., Romer F. (1998). Degeneration of moulting glands in male crickets. *Journal of Insect Physiology*, 44: 981-989.
- Mastrangelo A.J., Betenbaugh M.J. (1998). Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *Trends in Biotechnology*, 16: 88-95.
- Mastrangelo A.J., Zou S., Hardwick J.M., Betenbaugh M.J. (1999). Antiapoptosis chemicals prolong productive lifetimes of mammalian cells upon Sindbis virus vector infection. *Biotechnology and Bioengineering*, 65: 298-305.
- Mastrangelo A.J., Hardwick J.M., Bex F., Betenbaugh M.J. (2000a). Part. I. Bcl-2 and Bcl-xL limit apoptosis upon infection with alphavirus vectors. *Biotechnology and Bioengineering*, 67: 544-554.
- Mastrangelo A.J., Hardwick J.M., Zou S., Betenbaugh M.J. (2000b). Part II. Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotechnology and Bioengineering*, 67: 555-564.
- Masuda S., Moon S.K., Kambe T., Nagao M., Sasaki R. (2000). A new biological strategy for high productivity of recombinant proteins in animal cells by the use of hypoxia-response enhancer. *Biotechnology and Bioengineering*, 67: 157-164.
- Matsumoto N., Nakasono S., Ohmura N., Saiki H. (1999). Extension of logarithmic growth of *Thiobacillus ferrooxidans* by potential controlled electrochemical reduction of Fe (III). *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 716-721.
- Mege R.M., Bourdillon Ch. (1985). Nickel controls the reversible anaerobic activation/inactivation of the *Desulfovibrio gigas* hydrogenase by the redox potential. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 14701-14706.
- Meister A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 17205-17208.
- Meister A., Anderson M.E. (1983). Glutathione. *Annual Reviews of Biochemistry*, 52:711-760.
- Mendonça R.Z., Palomares L.A., Ramírez O.T. (1998). An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *Journal of Biotechnology*, 72: 61-75.
- Meneses A., Gómez A., Ramírez O.T. (1999). Feedback control of redox potential in hybridoma cell cultures. In: Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F, (eds). *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 23-27.
- Meneses-Acosta A., Mendonça R., Merchant H., Covarrubias L., Ramírez O.T. (2001). Comparative characterization of apoptosis in Sf-9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 72: 441- 457.

- Mercille S., Massie B. (1994a). Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 1140-1154.
- Mercille S., Massie B. (1994b). Induction of apoptosis in oxygen deprived cultures of hybridoma cells. *Cytotechnology*, 15: 117-128.
- Mignotte B., Vayssiere J.L. (1998). Mitochondria and apoptosis. *European Journal of Biochemistry*, 252: 1-15.
- Miller W.M., Wilke C.R., Blanch H.W. (1987). Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *Journal of Cellular Physiology*, 132: 524-530.
- Moran E., MCGowan S., Reynolds N., Wilson C. (1999). Effect of bioreactor process control parameters on apoptosis and monoclonal antibody production during the protein-free fed-batch culture of a murine myeloma. In: Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F, (eds). *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 51-53.
- Morris J.G. (1982). Oxidación y Reducción. En: *Fisicoquímica para biólogos*. Ed. Reverté, S.A., Barcelona, España, pp. 321-341.
- Mosser D.D., Massie B. (1994). Genetically engineering mammalian cell lines for increased viability and productivity. *Biotechnology Advances*, 12: 253-277.
- Nagarathnamma Rajan M.M., Sureshkumar G.K. (1997). Apoptosis extent increases in hybridoma cultures with temperature. *Biotechnology Letters*, 19: 669-673.
- Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annual Review of Immunology*, 15: 351-369.
- Oh D.K., Kim S.Y., Kim J.H. (1998). Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 58: 440-444.
- Ohmori H., Yamamoto I. (1982). Mechanism of augmentation of the antibody response *in vitro* by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes. I. 2-Mercaptoethanol-induced stimulation of the uptake of cystine, an essential amino acid. *Journal of Experimental Medicine*, 155:1277-1290.
- Ohmori H., Yamamoto I. (1983a). Mechanism of augmentation of the antibody response *in vitro* by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes. II. A major role of the mixed disulfide between 2-mercaptoethanol and cysteine. *Cellular Immunology*, 79: 173-185.
- Ohmori H., Yamamoto I. (1983b). Mechanism of augmentation of the antibody response *in vitro* by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes. III. Serum-bound and oxidized 2-mercaptoethanol are available for the augmentation. *Cellular Immunology*, 79: 186-196.
- Ohyama H., Yamada T., Watanabe I. (1981). Cell volume reduction associated with interphase death in rat thymocytes. *Radiation Research*, 85: 333-339.
- Oikawa S.T., Oikawa S., Kawanishi M., Yamada M., Kawanishi, S. (1999). Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis. *FEBS Letters*, 442: 65-69.

- Oktabr'skii O.N., Smirnova G.V. (1989). Changes in the redox potential and number of accessible SH groups in cultures of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* during transient process. *Biochemistry USSR*, 53: 1749-1755.
- Oktyabr'skiy O.N., Smirnova G.V. (1989). Dynamics of redox potential in bacterial cultures growing on media containing different sources of carbon, energy and nitrogen. *Acta Biotechnologica*, 9: 203-209.
- Onada, T. (1995). Purification of polluted water by diffusing it in soil. Patent Jpn. JP07214085, 15.08.95.
- Otero A.S., Karsan A., Cornejo C.J., Xiang H., Eunson T., Morrison R.S., Kay M., Winn R., Harlan J. (1999). Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 8039-8045.
- Ozturk S.S., Palsson B.O. (1990). Effects of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture. *Biotechnology Progress*, 6: 437-448.
- Ozturk S.S., Palsson, B.O. (1991). Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnology Progress*, 7: 481-494.
- Plushkell S.B., Flickinger M.C. (1996). Improved methods for investigating the external redox potential in hybridoma cell culture. *Cytotechnology*, 19: 11-26.
- Pollard M.G., Travers K.J., Weissman J.S. (1998). Ero1p: A novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 1: 171-182.
- Preez J.C., Driessel V.B., Prior B.A. (1988). The relation between redox potential and D-xilose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, 10: 901-906.
- Prikhod'ko G.G., Wang Y., Freulich E., Prives C., Miller L.K. (1999). Baculovirus p33 binds human p53 and enhances p53-mediated apoptosis. *Journal of Virology*, 73: 1227-1234.
- Ramírez, O.T. (1993). Cultivo de hibridomas a gran escala para la producción *in vitro* de anticuerpos monoclonales. En Escalamiento de procesos biotecnológicos. Rodolfo Quintero y Agustín López-Munguía (eds.). Sede de la Universidad de las Naciones Unidas, Tokio.
- Ramírez O.T., Mutharasan R. (1990). Cell cycle and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 36: 839-848.
- Reichmuth D.S., Hittle J.L., Blanch H.W., Keasling, J.D. (2000). Biodesulfurization of dibenzothiophene in *Escherichia coli* is enhanced by expression of *Vibrio harveyi* oxidoreductase gene. *Biotechnology and Bioengineering*, 67: 72-79.
- Riondet Ch., Cachon R., Waché Y., Alcaraz G., Divies Ch. (2000). Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182: 620-626.

- Roberts D.J., Ahmad F., Pendharkar S. (1996). Optimization of an aerobic polishing stage to complete anaerobic treatment of munitions-contaminated soils. *Environmental Science Technology*, 30: 2021-2026.
- Robillard G.T., Konings W.N. (1982). A hypothesis for the role of dithiol-disulfide interchange in solute transport and energy-transducing process. *European Journal of Biochemistry*, 127: 597-604.
- Rodríguez L., Reyes-Esparza J.A. (1995). Apoptosis: Características generales y sus implicaciones en procesos fisiopatológicos. *Biotecnología Aplicada* 12: 1-8.
- Romein B., Shrivastava A.K., Hellinga C. (1994). Control of cell concentration in fed-batch hybridoma cultures. *Cytotechnology* 14: supplement. 1, 6.34.
- Ryabova L.A., Desplancq D., Spirin A.S., Plückthun, A. (1997). Functional antibody production using cell-free translation: effects of protein disulfide isomerase and chaperones. *Nature Biotechnology*, 15: 79-84.
- Samuelsson E., Jonasson P., Viklund F., Nilsson B., Uhlen M. (1996). Affinity-assisted *in vivo* folding of a secreted human peptide hormone in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 14: 751-755.
- Sanfeliu A., Stephanopoulos G. (1999). Effect of glutamine limitation on the death of attached Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 46-53.
- Sassi A.H., Deschamps A.M., Lebeault, J.M. (1996). Process analysis of L-Lysine fermentation with *Corynebacterium glutamicum* under different oxygen and carbon dioxide supplies and redox potentials. *Process Biochemistry*, 31: 493-497.
- Schopf B., Howaldt M.W., Bailey J.E. (1990). DNA distribution and respiratory activity of *Spodoptera frugiperda* populations infected with wild-type and recombinant *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Biotechnology*, 15: 169-186.
- Schwartzman R.A., Cidlowski J.A. (1993). Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*, 14: 133-151.
- Shimizu S., Eguchi Y., Kosaka H., Kamike W., Matsuda H., Tsujimoto Y. (1995). Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature*, 374: 811-813.
- Sies H., Akerboom T.P.M. (1984). Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. *Methods in Enzymology*, 105: 445-451.
- Simpson N.H., Singh R.P., Perani A., Goldenzon C., Al-Rubeai M. (1998). In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of the *bcl-2* gene. *Biotechnology and Bioengineering*, 59: 90-98.
- Simpson N.H., Singh R.P., Emery A.N., Al-Rubeai M. (1999). Bcl-2 over-expression reduces growth rate and prolongs G1 phase in continuous chemostat cultures of hybridoma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 174-186.
- Singh R.P., Al-Rubeai M., Gregory C.D., Emery A.N. (1994). Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 720-726.

- Singh R.P., Emery A.N., Al-Rubeai M. (1996). Enhancement of survivability of mammalian cells by overexpression of the apoptosis-suppressor gene *bcl-2*. *Biotechnology and Bioengineering*, 52: 1-10.
- Singh R.P., Finka G., Emery A.N., Al-Rubeai M. (1997). Apoptosis and its control in cell culture systems. *Cytotechnology*, 23: 87 - 93.
- Singh R.P., Al-Rubeai M. (1999). Apoptosis. In Flickinger MC, Drew SW, (eds). *Encyclopedia of bioprocess technology. Fermentation , biocatalysis, and bioseparation. Vol I. Wiley-Interscience, New York.. pp. 191 – 201.*
- Smith C.A., Williams G.T., Kingston R., Jenkinson E.J., Owen J.J.T. (1989). Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, 337: 181-183.
- Stacey A. (2000). Animal cell lines, hybridoma cells. In Spier RE, (ed). *Encyclopedia of Cell Technology. Vol I. John Wiley & Sons Inc., New York., pp. 83-88.*
- Stephanopoulos G. (1984). Chemical process control. An introduction to theory and practice. Prentice Hall Inc. New Jersey, pp. 352 – 355.
- Stuart S.L. Woods S., Lemmon T., Ingle J., Westall J. (1996). Effects of redox potential and hydrogen concentration on reductive dechlorination of pentachlorophenol by an acetate-deficient methanogenic culture. Abstracts of General Meeting of American Society of Microbiology, 96 Meet., 416.
- Stuart S.L., Woods S., Lemmon T.L., Jr Ingle J.D. (1999). The effect of redox potential changes on reductive dechlorination of pentachlorophenol and the degradation of acetate by a mixed, methanogenic culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 63: 69-78.
- Suda N., Morita I., Kuroda T., Murota S. (1993). Participation of oxidative stress in the process of osteoclast differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1157: 318-323.
- Terada S., Komatsu T., Fujita T., Terakawa A., Nagamune T., Takayama S., Reed J.C., Suzuki, E. (1999). Co-expression of *bcl-2* and *bag-1* apoptosis suppressing genes, prolonged viable culture period of hybridoma and enhanced antibody production. *Cytotechnology*, 31: 141-149.
- Thompson B.G., Gerson D.F. (1985). Electrochemical control of redox potential in batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 1512-1515.
- Torchinskii I.M. (1981). Sulphur in proteins. Ed. Oxford, New York, pp. 48-65.
- Tremblay, C.V., Beaubien, A., Charles, P. and Nicell, J.A. (1998). Control of biological iron removal from drinking water using oxidation-reduction potential. *Water Science Technology*, 38: 121-128.
- Vaux D.L., Strasser A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of National Academic of Sciences USA*, 93: 2239-2244.
- Vernooij S.Y., Copeland J., Ghaboosi N., Griffin E.E., Yoo, S.J. Hay, B.A. (2000). Cell death regulation in *Drosophila*: conservation of mechanism and unique insights. *Journal of Cellular Biology*, 150: F69-76.

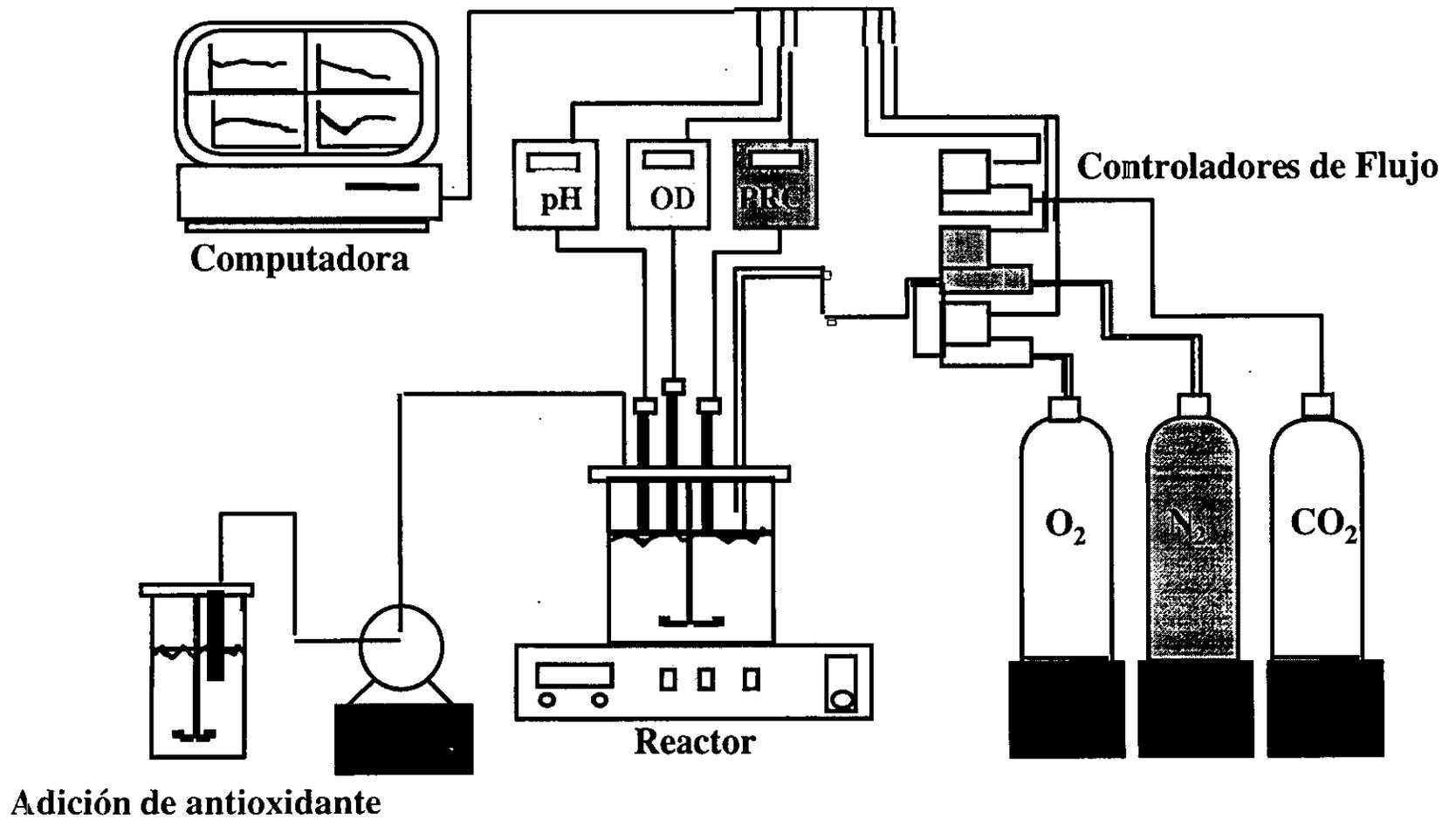
- Vidal E.S., Lomelí H., Obregon S.C., Cuervo R., Alcalde D.E., Covarrubias, L. (1998). Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Experimental Cell Research*, 238: 136-147.
- Villaseñor F. (1998). Evaluación de los sistemas enzimáticos glutamino sintetasa y glutamato deshidrogenasa para la eliminación de amonio del medio de cultivo de células eucariotes superiores. Tesis de Maestría en Biotecnología. IBT-UNAM, pp. 5 - 14.
- Walker K.W., Gilbert H.F. (1997). Scanning and escape during protein-disulfide isomerase-assisted protein folding. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 8845-8848.
- Wang Y.T., Xiao C. (1995). Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria. *Water Research*, 29: 2467-2474.
- Weiss R.A. (1982). Hybridomas produce viruses as well as antibodies. *Immunology*, 3: 292-293.
- Westlund A., Häggström L. (1998). Ammonium ion transport by the $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ cotransporter induces apoptosis in hybridoma cells. *Biotechnology Letters*, 20: 87-90.
- White C., Sampson C., Burke J., Smith A. (1995). Investigation of redox state of recombinant horseradish peroxidase-produced in inclusion bodies and factors affecting the efficiency of refolding. *Biochemical Society Transition*, 23: 1: 138S.
- Wiles C.C., Smith V. (1969). Oxidation-reduction potential controlled submerged tissue culture fermentation in pilot-scale fermentors. American Institute of Chemical Engineering Symposium of Bioengineering and Technology, November, 85 – 93.
- Wimpenny J.W.T., Necklen D.K. (1973). The redox environment and microbial physiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 46: 352-359.
- Wittrup D.K. (1995). Disulfide bond formation and eukaryotic secretory productivity. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 203-208.
- Wolfreys K., Oliveira D.B.G. (1997). Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. *European Journal of Immunology*, 27: 297-306.
- Xu F., Shin W., Brown S.H., Wahleithner J.A., Sundaram U.M., Solomon E.I. (1996). A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1292: 303-311.
- Xue L., Fletcher G.C., Tolkovsky A.M. (1999). Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 14: 180-198
- Zamudio F., Saavedra R., Martin B.M., Briones G.G., Herion P., Possani L.D. (1992). Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *European Journal of Biochemistry*, 204: 281-292.

- Zanghi J.A., Fussenegger M., Bailey J.E. (1999). Serum protects protein-free competent Chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 108-119.
- Zheng M., Aslund F., Storz G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, 279: 1718-1721.
- Ziegler D.M. (1985). Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 54: 305-329.
- Zmuda J., Friedenson B. (1983). Changes in intracellular glutathione levels in stimulated and unstimulated lymphocytes in the presence of 2-mercaptoethanol or cysteine. *Journal of Immunology*, 130: 362-364.
- Zupke C., Sinskey A.J., Stephanopoulos G. (1995). Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 27-36.

APENDICE A

Diagrama del sistema de control y adquisición de datos.

Figura A.1. Diagrama del Sistema de Control



APENDICE B

Listado del programa de control del potencial redox del cultivo.

```

START
LIBRARY "TurboDrivers INTERFACE"
LIBRARY "DATAMANIPULATION INTERFACE"
DIM ENT%(7): DIM ENT!(7)
CLS
MENU 2.0.1."MENU OFF"
MENU 1.0.1."INTERACTUAR"
MENU 1.1.1."CAMBIAR PARAMETROS":CMDKEY 1.1."P"
MENU 1.2.1."DETENER":CMDKEY 1.2."D"
MENU 1.3.1."REINICIAR":CMDKEY 1.3."R"
MENU 1.4.1."TERMINAR":CMDKEY 1.4."T"

ON MENU GOSUB INTERAC: MENU ON

PRINC
REM"ENTRADA DE DATOS
WINDOW 2."ARCHIVOS". (110,140)-(350,200),1
PRINT "Nombre del Archivo "
PRINT"(no repetir nombre ya usado)"
INPUT ARCHIVOS
START2
REM"NO ABRE ARCHIVO NUEVO SI NO QUE PERMITE AGREGAR TIEMPO
REM"Y ALMACENA EN EL PROGRAMA ORIGINAL

WINDOW 2."PARAMETROS". (0,40)-(510,380),1
TIEMADICIONAL=TIEMADICIONAL+1
INPUT "Intervalo de Adquisición de Datos (seg) [TAD]:"TI
INPUT "Tiempo de la Fermentación (Hrs.):"TFH
INPUT "Flujo Total de Gases de Entrada en ccpm (no exceder de 1000):"FG% : PRINT
PRINT "Composición Inicial de los Gases de Entrada"
INPUT "% N2 (sugerido:74.26%):" N2!
IF N2!<0 THEN N2!=74.26: PRINT N2!
INPUT "% O2 (sugerido:19.74%):" O2!
IF O2!<0 THEN O2!=19.74:PRINT O2!
INPUT "% CO2 (sugerido: 6.0%)(10% máximo si flujo total es 1000):" CO2!
IF CO2!<0 THEN CO2!=6: PRINT CO2!: PRINT
REM"EVITA QUE EL % DE FLUJOS SOBREPASE EL 100%"
IF N2!+O2!+CO2!>100 THEN PRINT:PRINT"FLUJOS >>100%! " :GOTO START2

DOPHORDX
PRINT "Que deseas controlar?"
PRINT "% de Oxigeno Disuelto y/o pH (1)"
REM"SI LA OPCION=1 EL PROGRAMA ES EL ORIGINAL
PRINT "Potencial Redox del Cultivo (2)"; INPUT OPCION
REM"SI LA OP=2 EL PROGRAMA HACE CONTROL SOBRE REDOX
IF OPCION>2 THEN GOTO DOPHORDX
IF OPCION=1 THEN GOTO ENTRADADO
IF OPCION=2 THEN GOTO ENTRADARDX

ENTRADADO:
REM"PROGRAMA ORIGINAL
GAINPRC=-1
INPUT "% de Oxigeno Disuelto Deseado": SDO!
INPUT "Banda de Tolerancia para Oxigeno Disuelto (+/- %DO)":TOLDO
INPUT "Ganancia para Oxigeno Disuelto " :GAINDO
INPUT "Tiempo de Control para el OD (seg) [> TAD]": DELTA1!
PRINT "Tambien deseas controlar el pH?"
PRINT "Si (1)"
PRINT "No (2)"; INPUT SUBOP
IF SUBOP>2 THEN GOTO ENTRADADO
IF SUBOP=1 THEN GOTO ENTRADAPH
IF SUBOP=2 THEN GAINPH=-1
VARIA=0
GOTO CONSTANTES

ENTRADAPH:
INPUT "pH deseado": SPH!
INPUT "Banda de Tolerancia para pH (+/- pH)": TOLPH
INPUT "Ganancia para control de pH " :GAINPH
INPUT "Tiempo de Control para el pH (seg) [> TAD]": DELTA2!
REM"DEBE IR A CONTROLPH
GOTO CONSTANTES
REM"FIN DE LA ENTRADA PARA EL PROGRAMA ORIGINAL

REM"ACQUI CONTROLA EL REDOX
ENTRADARDX
INPUT "Que valor de potencial redox deseas en el cultivo (mV) [PRC]:"SREDOX!
INPUT "Banda de Tolerancia para el PRC (+/- mV)":TOLPRC
INPUT "Ganancia para el PRC " :GAINPRC
INPUT "Tiempo de Control para el PRC (seg) [> TAD]": DELTA3!
REM"ES UN VALOR REAL
PRINT "Deseas controlar el redox por variación del %DO (1)"
PRINT "o del pH (2)"
PRINT "o por ambas (3)"; INPUT VARIA
IF VARIA>3 THEN GOTO ENTRADARDX
IF VARIA=1 THEN GOTO SUBENTPH
IF VARIA=2 THEN GOTO SUBENTDO
IF VARIA=3 THEN
PRINT "En caso de que utilices la opción (3), introduce los tiempos de control que
desees"
INPUT "Tiempo de control para el DO (seg) [>TAD]": DELTA4!

```

```

INPUT "Tiempo de control para el pH (seg) [>TAD]": DELTA5!
END IF
IF VARIA=3 THEN DELTA3!=0
IF VARIA =3 THEN GOTO CONSTANTES

SUBENTPH:
REM"SE PRETENDE CONTROLAR EL PH EN EL VALOR DADO Y VARIAR EL
REM"DO PARA CONTROL DEL REDOX
INPUT "pH deseado": SPH!
INPUT "Banda de Tolerancia para pH (+/- pH)":TOLPH
INPUT "Ganancia para control de pH " :GAINPH
INPUT "Tiempo de Control para el pH (seg) [> TAD]": DELTA2!
REM"DEBE IR A CICLO CONTDORDX PARA CONTROLAR REDOX Y MANTENER PH CTE
GOTO CONSTANTES

SUBENTDO:
REM"SE PRETENDE CONTROLAR EL DO EN UN VALOR DADO Y VARIAR EL PH
INPUT "% de oxigeno disuelto deseado": SDO!
INPUT "Banda de Tolerancia para Oxigeno Disuelto (+/- %DO)":TOLDO
INPUT "Ganancia para Oxigeno Disuelto " :GAINDO
INPUT "Tiempo de Control para el DO (seg) [> TAD]": DELTA1!
REM"DEBE IR A CONTROLPHDX PARA CONTROLAR REDOX Y MANTENER EL DO CTE
GOTO CONSTANTES

CONSTANTES:
PRINT "Factor de Corrección por Diferencia de Presión de las Condiciones Estánda
"
INPUT " = 1.225 para Cuernavaca": ALFA
IF ALFA=0 THEN ALFA=1.225
PRINT ALFA
WINDOW CLOSE 2

TFS=TFH*3600
IF TI <.001 THEN TI =1
NP=TFS/TI
DIM DOP!(NP+10):DIM PHP!(NP+10):DIM O2P!(NP-10):DIM N2P!(NP-10):
DIM CO2P!(NP+10):DIM REDOXP!(NP+10):DIM TRHF!(NP+100):DIM TLRP!(NP-10):DIM
NOCMP!(NP-10)
DIM value%(15):DIM value!(15)
ER%=0:slot%=1:value%(0)=0:LSB=10000/4076:LSB2=15258789052:ER%=0
FOR bit%=0 TO 7
CALL setDoutbit (bit%,1,slot%,VARPTR(ER%))
NEXT bit%

ARCHIVO1$="Macintosh HD:USUARIOS:ANGELICA:DATOS:"-ARCHIVOS-"1"
ARCHIVO2$="Macintosh HD:USUARIOS:ANGELICA:DATOS:"-ARCHIVOS-"1"PH"
ARCHIVO3$="Macintosh HD:USUARIOS:ANGELICA:DATOS:"-ARCHIVOS-"1"RDx"
ARCHIVO4$="Macintosh HD:USUARIOS:ANGELICA:DATOS:"-ARCHIVOS-"1"DO"
ARCHIVO5$="Macintosh HD:USUARIOS:ANGELICA:DATOS:"-ARCHIVOS-"1"O2"
ARCHIVO6$="Macintosh HD:USUARIOS:ANGELICA:DATOS:"-ARCHIVOS-"1"CO2"
ARCHIVO7$="Macintosh HD:USUARIOS:ANGELICA:DATOS:"-ARCHIVOS-"1"N2"
ARCHIVO8$="Macintosh HD:USUARIOS:ANGELICA:DATOS:"-ARCHIVOS-"1"TR"
ARCHIVO9$="Macintosh HD:USUARIOS:ANGELICA:DATOS:"-ARCHIVOS-"1"NOCM"

REM"SET POINT DE LOS GASES

VLT=5*(FG%/ALFA/LSB)^1.054563-43.8383
VLT2=50*(FG%/ALFA/LSB2)
FLUJOO2S!=(O2!FG%/100)^5.005-129.564
FLUJON2S!=(N2!FG%/100)^4.554-190.259
FLUJOCO2S!=(CO2!FG%/100)^23.453-5.625
SPO2%=FLUJOO2S!*VLT/(5*FG%)
SPN2%=FLUJON2S!*VLT/(5*FG%)
SPO2%=FLUJOCO2S!*VLT2/(50*FG%)

REM"CONTADORES INICIALES PARA PROMEDIO
CON1=1
CON2=1
REM"NP PUEDE SER UN NUMERO Z COMPRESIBUIDAD
IF NP = 207 THEN COMP%=0
IF NP < 207 THEN COMP%=207/NP*(-1)
IF NP > 207 THEN COMP%=NP/207
REM" ABRE Y CIERRA ARCHIVOS PARA SALIDA DE DATOS
OPEN "O".#1,ARCHIVO1$: CLOSE #1
OPEN "O".#2,ARCHIVO2$: CLOSE #2
OPEN "O".#3,ARCHIVO3$: CLOSE #3
OPEN "O".#4,ARCHIVO4$: CLOSE #4
OPEN "O".#5,ARCHIVO5$: CLOSE #5
OPEN "O".#6,ARCHIVO6$: CLOSE #6
OPEN "O".#7,ARCHIVO7$: CLOSE #7
OPEN "O".#8,ARCHIVO8$: CLOSE #8
OPEN "O".#9,ARCHIVO9$: CLOSE #9

REM" CREA LA PANTALLA INICIAL: DONDE DICE UNAM.BT.
CALL PANTALLA

INICIO.
REM" ESTABLECE LA HORA Y FECHA DE CORRIDA
TIEMPO0=TIMER

```

```

FECHAS=DATES
REM*INICIALIZA LOS CONTADORES DE TIEMPO EN CERO
DIAS=0
TIEMPO1=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO4=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO5=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO6=TIMER+(DIAS*86400!)

CICLO:
REM*INICIA EL CICLO DE CONTROL ORIGINAL
REM* ESTABLECE QUE HA PASADO UN DIA ...
IF FECHAS<DATES THEN DIAS=DIAS+1
FECHAS=DATES
TRH= CTE + ((TIMER-TIEMPO0)/DIAS*86400&)/3600
REM* ESTO SOLO LO HACE AL INICIO DE LA CORRIDA O AL AGREGAR TIEMPO: INICIALIZA
TRH1
IF CON2=1 THEN TRH1=TRH

REM* LLAMA LOS CANALES AOUT, AINB E ITOS

CALL CWRITE(145.64 SPO2%,slot%,VARPTR(ER%))
CALL CWRITE(145.72,SPN2%,slot%,VARPTR(ER%))
CALL CWRITE(129.12&,SPCO2%,slot%,VARPTR(ER%))

setad 0, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 1, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 2, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 3, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 4, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 5, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 6, 1, slot%,VARPTR(ER%)
setad 7, 1, slot%,VARPTR(ER%)
cread 0, 0, VARPTR(value%*(0)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 1, 0, VARPTR(value%*(1)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 2, 0, VARPTR(value%*(2)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 3, 0, VARPTR(value%*(3)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 4, 0, VARPTR(value%*(4)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 5, 0, VARPTR(value%*(5)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 6, 0, VARPTR(value%*(6)), slot%, VARPTR(ER%)
cread 7, 0, VARPTR(value%*(7)), slot%, VARPTR(ER%)
IF ER%<>0 THEN GOTO ErrorReport
CALL ITOS (VARPTR (value%*(0)),VARPTR (value%*(0)),0,7)

REM*REALIZA LECTURA CON EL SENSOR DE OXIGENO DISUELTO
DO!={(value!(0)*LSB)/0.4921}
REM* IMPRIME EN PANTALLA EL VALOR DO
FORECOLOR 33:LOCATE 7,16:PRINT USING "Oxigeno Disuelto = ####.#":DO!

REM*DETECTA CON EL SENSOR EL VALOR DE POTENCIAL HIDROGENO
PH!={(value!(1)*LSB)/0.33712}

REM* IMPRIME EN PANTALLA EL VALOR DE PH
FORECOLOR 205:LOCATE 7,70:PRINT USING "pH = #####.##":PH!

REM* MIDE EL VALOR DE TURBIDEZ Y CALCULA EL NO DE CELULAS TOTALES/ML
TUR!=value!(2)
IF TUR!<=0 THEN TUR!=.001
NOCM!=.00204*TUR!-.353
IF NOCM!<=0 THEN NOCM!=0
FORECOLOR 341:LOCATE 8,70:PRINT USING "No. cells(E6)/ml = #####.###":NOC
FORECOLOR 273:LOCATE 9,70: PRINT USING "TURBIDEZ=#####.###":TUR!

REM* MIDE CON LOS SENSORES LOS FLUJOS DE O2, N2 Y CO2 E IMPRIME LOS VALORES
FORECOLOR 33:LOCATE 20,6: PRINT "Entrada de Gases"
FLUJOO2!={(((value!(5)*100/VLT)*FG%/100))*1.769-3.784}*ALFA
O2!=FLUJOO2!*100*FG%
IF O2!<0 THEN O2!=0: IF O2!>100 THEN O2!=100
FORECOLOR 273:LOCATE 20,21:PRINT USING "O2: ###.###":O2!
FLUJON2!={(((value!(6)*100/VLT)*FG%/100))*1.765-2.157}*ALFA
N2!=FLUJON2!*100*FG%
IF N2!<0 THEN N2!=0: IF N2!>100 THEN N2!=100
FORECOLOR 341:LOCATE 20,33:PRINT USING "N2: ###.###":N2!
FLUJOCO2!={(((value!(7)*2*50/VLT2)*FG%/100))*26.087-.427}*ALFA
CO2!=FLUJOCO2!*100*FG%
IF CO2!<0 THEN CO2!=0: IF CO2!>100 THEN CO2!=100
FORECOLOR 205:LOCATE 20,45:PRINT USING "CO2: ###.###":CO2!
SUMAG!=O2!+N2!+CO2!
LOCATE 21,21:PRINT USING "SUMA GASES (%)= ###.##":SUMAG%

REM* MIDE EL VALOR REDOX Y LO IMPRIME EN PANTALLA
REDOX!=value!(3)*LSB*.2026-509.56

FORECOLOR 409:LOCATE 20,70:PRINT USING "p REDOX = #####.##":REDOX!
FORECOLOR 33:LOCATE 4,85:PRINT DATES:LOCATE 5,85:PRINT TIMES
FORECOLOR 137 LOCATE 18,15:PRINT USING "Tiempo Transcurrido = ###.### Hrs":
TRH:FORECOLOR 33

REM* SE HACE EL PROMEDIO DE LOS VALORES CALCULADOS Y LEIDOS

```

```

PHS!=PH!+PHS:PHP!(CON1)=PHS/CON2
O2S!=O2!+O2S:O2P!(CON1)=O2S/CON2
N2S!=N2!+N2S:N2P!(CON1)=N2S/CON2
CO2S!=CO2!+CO2S:CO2P!(CON1)=CO2S/CON2
REDOXS!=REDOX!+REDOXS:REDOXP!(CON1)=REDOXS/CON2
TURS!=TUR!+TURS:TURP!(CON1)=TURS/CON2
NOCMS!=NOCM!+NOCMS:NOCMP!(CON1)=NOCMS/CON2
TRH2=TRH
TRHP!(CON1)=(TRH1+TRH2)/2

REM* MANDA A GRAFICAR LOS VALORES
CALL PLOT (1,70,185,28,VARPTR (DOP!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,11,
FORECOLOR 341:CALL PLOT (1,70,185,264,VARPTR (NOCMP!(0)),4,0,CON1,COMP%,0,
FORECOLOR 205:CALL PLOT (1,70,185,264,VARPTR (PHP!(0)),8,5,CON1,COMP%,0,11,0
FORECOLOR 273:CALL PLOT (1,217,332,28,VARPTR (O2P!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,1
FORECOLOR 341:CALL PLOT (1,217,332,28,VARPTR (N2P!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,1
FORECOLOR 205:CALL PLOT (1,217,332,28,VARPTR (CO2P!(0)),100,0,CON1,COMP%,0,
FORECOLOR 409:CALL PLOT (1,217,332,264,VARPTR (REDOXP!(0)),300,0,CON1,COMP%
0,11,0)

REM* AUMENTA EL CONTADOR PARA QUE EN LOS PROXIMOS CALCULOS TOMA UN PROMEDIO
DE CON2 VALORES
CON2=CON2+1
TIEMPO3=TIMER+(DIAS*86400!)
REM* RECONSTRUYE LA PANTALLA INICIAL
IF MOUSE(0) <> 0 THEN CALL PANTALLA

REM* COMPARA EL TIEMPO TRANSCURRIDO CON EL SUPUESTO INICIAL DE CORRIDA
IF TRHP!(CON1) > TFH THEN GOTO FINAL

REM*MANDA A GUARDAR EN LOS ARCHIVOS DE LA SUBROUTINA 'SALVAR' CADA TIEMPO
IF (TIEMPO3-TIEMPO1) >= TI! THEN GOTO SALVAR
REM*MANDA A LA SUBROUTINA CONTROLDO O AL CONTROLREDOX
IF VARIA=1 AND (TIEMPO3-TIEMPO5)>= DELTA3! THEN GOTO CONTDORDX
IF VARIA=2 AND (TIEMPO3-TIEMPO6)>= DELTA3! THEN GOTO CONTPHRDX

IF VARIA<>1 AND (TIEMPO3-TIEMPO2) >= DELTA1! THEN GOTO CONTROLDO
IF VARIA<>2 AND (TIEMPO3-TIEMPO4) >= DELTA2! THEN GOTO CONTROLPH
IF VARIA=3 THEN
IF (TIEMPO3-TIEMPO5)>= DELTA4! THEN GOTO CONTDORDX
IF (TIEMPO3-TIEMPO6)>= DELTA5! THEN GOTO CONTPHRDX
END IF

REM*REGRESA A CICLO
GOTO CICLO

CONTROLDO:
VLT={5*(FG%/ALFA/LSB)*1.054563+43.8383}
VLT2=50*(FG%/ALFA/LSB2)

IF GAINDO = -1 THEN GOTO CONTROLPH
DIFDO!={SDO!-DOP!(CON1)}
IF DIFDO! > TOLDO THEN SPO2%=SPO2%+(DIFDO!/GAINDO)
IF DIFDO! < (-1)*TOLDO THEN SPO2%=SPO2%-ABS(DIFDO!/GAINDO)
IF SPO2% < 0 THEN SPO2%=0
IF SPO2% > VLT THEN SPO2%=VLT
FLUJOCO2S!={SPCO2%*50*FG%/VLT2+5.625}/23.453
FLUJOO2S!={SPO2%*5*FG%/VLT-129.984}/5.005
FLUJON2S!={FG%-(FLUJOO2S!+FLUJOCO2S!)}*4.554+190.259
SPN2%=FLUJON2S!/VLT*(5*FG%)
IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0
IF SPN2% > VLT THEN SPN2%=VLT
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)
GOTO CICLO

CONTROLPH:
VLT={5*(FG%/ALFA/LSB)*1.054563+43.8383}
VLT2=50*(FG%/ALFA/LSB2)

IF GAINPH = -1 THEN GOTO CICLO
DIFPH!={SPH!-PHP!(CON1)}
IF DIFPH!>TOLPH THEN SPCO2%=SPCO2%+(DIFPH!/GAINPH)
IF DIFPH! < (-1)*TOLPH THEN SPCO2%=SPCO2%+ABS(DIFPH!/GAINPH)
IF SPCO2%<0 THEN SPCO2%=0
IF SPCO2% > VLT2 THEN SPCO2%=VLT2
FLUJOCO2S!={SPCO2%*50*FG%/VLT2+5.625}/23.453
FLUJOO2S!={SPO2%*5*FG%/VLT-129.984}/5.005
FLUJON2S!={FG%-(FLUJOO2S!+FLUJOCO2S!)}*4.554+190.259
SPN2%=FLUJON2S!/VLT*(5*FG%)
IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0
IF SPN2% > VLT THEN SPN2%=VLT
TIEMPO4=TIMER+(DIAS*86400!)
GOTO CICLO

```

```

CONTDORCX:
REM CONTROL DE REDOX POR DO
IF GAINPRC=-1 THEN GOTO CICLO
  VLT=(5*(FG*WALFALSB)*1.054563+43.8383)
  VLT2=50*(FG*WALFALSB2)

DIFRDX'=SREDOX'-REDOXP{(CON1)}
REM'AQUI SE EJERCE LA ACCION DE CONTROL
IF DIFRDX! > TOLPRC THEN SPO2%=SPO2%+(DIFRDX!'GAINPRC)
IF DIFRDX! < (-1)*TOLPRC THEN SPO2%=SPO2%-ABS(DIFRDX!'GAINPRC)
IF SPO2% < 0 THEN SPO2%=0
IF SPO2% > VLT THEN SPO2%=VLT
IF SPCO2% < 0 THEN SPCO2%=0
IF SPCO2% > VLT2 THEN SPCO2%=VLT2
  FLUJOCO2S'=(SPCO2%*50*FG%/VLT2+5.625)/23.453
  FLUJOO2S'=(SPO2%*5*FG%/VLT-129.984)/5.005
  FLUJON2S'=(FG%-(FLUJOO2S'+FLUJOCO2S!))*4.554+190.259
  SPN2%=(FLUJON2S!)/VLT/(5*FG%)
IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0
IF SPN2% > VLT THEN SPN2%=VLT
IF VARIa=3 THEN GOTO CONTPHRDX
TIEMPO5=TIMER-(DIAS*86400!)
GOTO CICLO

CONTPHRDX:
IF GAINPRC=-1 THEN GOTO CICLO
  VLT=(5*(FG*WALFALSB)*1.054563+43.8383)
  VLT2=50*(FG*WALFALSB2)

DIFRDX'=SREDOX'-REDOXP{(CON1)}
REM'VA AL CALCULO DEL PH QUE DEBE HABER EN EL SISTEMA
REM'AQUI SE EJERCE LA ACCION DE CONTROL SOBRE EL PH
IF DIFRDX! > TOLPRC THEN SPCO2%=SPCO2%+(DIFRDX!'GAINPRC)
IF DIFRDX! < (-1)*TOLPRC THEN SPCO2%=SPCO2%-ABS(DIFRDX!'GAINPRC)
IF SPCO2% < 0 THEN SPCO2%=0
IF SPCO2% > VLT2 THEN SPCO2%=VLT2
IF SPO2% < 0 THEN SPO2%=0
IF SPO2% > VLT THEN SPO2%=VLT
  FLUJOCO2S'=(SPCO2%*50*FG%/VLT2+5.625)/23.453
  FLUJOO2S'=(SPO2%*5*FG%/VLT-129.984)/5.005
  FLUJON2S'=(FG%-(FLUJOO2S'+FLUJOCO2S!))*4.554+190.259
  SPN2%=(FLUJON2S!)/VLT/(5*FG%)
IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0
IF SPN2% > VLT THEN SPN2%=VLT
TIEMPO6=TIMER-(DIAS*86400!)
GOTO CICLO

SALVAR:
REM'SE SALVAN LOS DATOS EN LOS ARCHIVOS CORRESPONDIENTES
OPEN "A".#1.ARCHIVO1S:OPEN "A".#2.ARCHIVO2S:OPEN "A".#3.ARCHIVO3S:
OPEN "A".#4.ARCHIVO4S:OPEN "A".#5.ARCHIVO5S:OPEN "A".#6.ARCHIVO6S:
OPEN "A".#7.ARCHIVO7S:OPEN "A".#8.ARCHIVO8S:OPEN "A".#9.ARCHIVO9S
WRITE #1, TRHP{(CON1)}:WRITE #2, PHP{(CON1)}:WRITE #3, REDOXP{(CON1)}:
WRITE #4, DOP{(CON1)}:WRITE #5, O2P{(CON1)}:WRITE #6, CO2P{(CON1)}:
WRITE #7, N2P{(CON1)}:WRITE #8, TURP{(CON1)}:WRITE #9, NOCMS{(CON1)}

CLOSE #1:CLOSE #2:CLOSE #3:CLOSE #4:CLOSE #5:CLOSE #6:CLOSE #7:CLOSE
#3:CLOSE #9

CON1=CON1+1
CON2=1
TIEMPO1=TIMER+(DIAS*86400!)
DOS!:=0:PHS!:=0:O2S!:=0:N2S!:=0:CO2S!:=0:REDOXS!:=0:TURS!:=0:NOCMS!:=0
GOTO CICLO

FINAL:
REM'MARCA EL RECUADRO CUANDO LA FERMENTACION TERMINA
WINDOW 3..(165,100)-(370,300),2
BEEP : BEEP : BEEP : BEEP
CALL TEXTFACE (1)
PRINT
PRINT "EL TIEMPO DE FERMENTACION"
PRINT
PRINT " HA TERMINADO"
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1."Continuar".(20,145)-(180,160),1
BUTTON 2,1."Terminar".(20,175)-(180,190),1
  r%(0)=175
  r%(1)=20
  r%(2)=150
  r%(3)=180
  InSelRect r%(0),-4,-4
PENSIZ 3.3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(0)
WEND

INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3: SYSTEM
IF BOTON=1 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3: CALL PANTALLA: GOTO EXTRA

INTERAC:
REM'NO SE PARA QUE FUNCIONA
NUMMENU=MENU(0): IF NUMMENU <> 1 THEN RETURN
ARTMENU=MENU(1)
ON ARTMENU GOSUB PARAM. DETENER, REINICIAR, TERMINAR
RETURN

PARAM:
REM'PANTALLA CUANDO SE QUIERE MODIFICAR ALGUN DATO
WINDOW 4..(135,25)-(380,400),2
CALL TEXTFACE (1)
PRINT " Parámetro a modificar:"
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1."Tiempo de Adquisición".(20,30)-(210,45),1
BUTTON 2,1."Tiempo de Fermentación".(20,50)-(210,65),1
BUTTON 3,1."Flujo Total de Gases".(20,70)-(210,85),1
BUTTON 4,1."P. Redox deseado (mV)".(20,90)-(210,105),1
BUTTON 5,1."DO deseado/medido".(20,110)-(210,125),1
BUTTON 6,1."pH deseado/medido".(20,130)-(210,145),1
BUTTON 7,1."Ganancia para el PRC".(20,150)-(210,165),1
BUTTON 8,1."Tolerancia PRC".(20,170)-(210,185),1
BUTTON 9,1."Tiempo de Control para PRC".(20,190)-(210,205),1
BUTTON 10,1."Ganancia DO".(20,210)-(210,225),1
BUTTON 11,1."Tolerancia DO".(20,230)-(210,245),1
BUTTON 12,1."Tiempo de Control para DO".(20,250)-(210,265),1
BUTTON 13,1."Ganancia pH".(20,270)-(210,285),1
BUTTON 14,1."Tolerancia pH".(20,290)-(210,305),1
BUTTON 15,1."Tiempo de Control para pH".(20,310)-(210,325),1
BUTTON 16,1."OK".(150,330)-(200,345),1
  r%(0)=330
  r%(1)=150
  r%(2)=345
  r%(3)=200
  InSelRect r%(0),-4,-4
PENSIZ 3.3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=16 OR DIALOGO=6 THEN WINDOW CLOSE 4: RETURN
ON BOTON GOSUB TADO, TFER, FLG, VPRC, OXI, PHD, GANPRC, TOLEPRC, TCONPR
C, GANDO, TOLEDO, TCONDO, GANPH, TOLEPH, TCONPH,
WINDOW CLOSE 4
RETURN

REM'EN LAS SIG. SUBROUTINAS SE CAMBIAN LOS PARAMETROS MENCIONADOS ARRIBA Y
REM'REGRESA A LA PANTALLA DE CAMBIO DE PARAMETROS
TADO:
CLS
TIO:=TI!
PRINT USING "Actual: ###.## seg.": TI!
INPUT "Tiempo de Adquisición": TI!
IF TI!=0 THEN TI:=TIO!
GOTO PARAM

TFER:
CLS
TFH:=TFH
PRINT USING "Actual: ###.## Hrs.": TFH
INPUT "Tiempo de Fermentación": TFH
IF TFH=0 THEN TFH=TFH0
  TFS=TFH*3600
  NP=TFS/TI
IF NP > 207 THEN COMP%=0
IF NP < 207 THEN COMP%=207/NP*(-1)
IF NP > 207 THEN COMP%=NP/207
  CON1 = 1
  CON2 = 1
GOTO PARAM

FLG:
CLS
FGO%=FG%
PRINT USING "Actual: ###.## SCCPM": FGO%
INPUT "Flujo Total de Gases": FGO%
IF FGO%=0 THEN FG%=FGO%
GOTO PARAM

VPRC:
CLS
REDOXO=SREDOX!
IF OPCION=2 THEN
PRINT USING "Actual: ###.## mV": SREDOX!
INPUT "Valor del Potencial Redox deseado": SREDOX!

```

```

END IF
IF OPCION=1 THEN
PRINT USING "Potencial Redox Medido:###.## mV": REDOX!
END IF
GOTO PARAM

```

OXI:

```

CLS
SDOO=S00!
IF OPCION=1 OR (OPCION=2 AND VARIA=2) THEN
PRINT USING "Actual: ###.## %": SDO!
INPUT "% de Oxígeno Deseado": S00!
IF SDO!=0 THEN SDO!=SDOO!
END IF
IF OPCION=2 AND VARIA<>2 THEN
PRINT USING "% de oxígeno medido:###.##%":DO!
END IF
GOTO PARAM

```

PHO:

```

CLS
SPHO=SPH!
IF OPCION=1 OR (OPCION=2 AND VARIA=1) THEN
PRINT USING "Actual: ###.##": SPH!
INPUT "pH Deseado": SPH!
IF SPH!=0 THEN SPH!=SPHO!
END IF
IF OPCION=2 AND VARIA<>1 THEN
PRINT USING "pH medido:###.##":PH!
END IF
GOTO PARAM

```

GAINPRC:

```

CLS
GAINPRCO=GAINPRC
IF OPCION=2 THEN
PRINT USING "Actual:###.##": GAINPRC
INPUT "Ganancia para el PRC": GAINPRC
IF GAINPRC=0 THEN GAINPRC=GAINPRCO
END IF
IF OPCION=1 THEN
PRINT:PRINT "No hay ganancia para el PRC"
END IF
GOTO PARAM

```

TOLEPRC:

```

CLS
TOLPRCO=TOLPRC
IF OPCION=2 THEN
PRINT USING "Actual:###.## mV": TOLPRC
INPUT "Tolerancia para el PRC": TOLPRC
IF TOLPRC=0 THEN TOLPRC=TOLPRCO
END IF
IF OPCION=1 THEN
PRINT:PRINT "No hay tolerancia para el PRC"
END IF
GOTO PARAM

```

TCONPRC:

```

CLS
DELTA30=DELTA3!
IF OPCION=2 THEN
PRINT USING "Actual: ###.## seg.": DELTA3!
INPUT "Tiempo de Control": DELTA3!
IF DELTA3!=0 THEN DELTA3!=DELTA30!
END IF
IF OPCION=1 THEN
PRINT:PRINT "No hay tiempo de control para el PRC"
END IF
GOTO PARAM

```

GAINDO:

```

CLS
GAINDOO=GAINDO
IF OPCION=1 OR (OPCION=2 AND VARIA=2) THEN
PRINT USING "Actual: ###.##": GAINDO
INPUT "Ganancia para DO": GAINDO
IF GAINDO=0 THEN GAINDO=GAINDOO
END IF
IF OPCION=2 AND VARIA<>2 THEN
PRINT:PRINT "No hay ganancia para DO"
END IF
GOTO PARAM

```

TOLEDO:

```

CLS
TOLDOO=TOLDO
IF OPCION=1 OR (OPCION=2 AND VARIA=2) THEN
PRINT USING "Actual: ###.## %":TOLDO
INPUT "Tolerancia para DO": TOLDO

```

```

IF TOLDO=0 THEN TOLDO=TOLDOO
END IF
IF OPCION=2 AND VARIA<>2 THEN
PRINT:PRINT "No hay tolerancia para DO"
END IF
GOTO PARAM

```

TCONDO:

```

CLS
DELTA10=DELTA1!
IF OPCION=1 OR (OPCION=2 AND VARIA=2) THEN
PRINT USING "Actual: ###.## seg.": DELTA1!
INPUT "Tiempo de Control": DELTA1!
IF DELTA1!=0 THEN DELTA1!=DELTA10!
END IF
IF OPCION=2 AND VARIA<>2 THEN
PRINT:PRINT "No hay Tiempo de control para DO"
END IF
GOTO PARAM

```

GAINPH:

```

CLS
GAINPHO=GAINPH
IF OPCION=1 OR (OPCION=2 AND VARIA=1) THEN
PRINT USING "Actual: ###.##": GAINPH
INPUT "Ganancia para pH": GAINPH
IF GAINPH=0 THEN GAINPH=GAINPHO
END IF
IF OPCION=2 AND VARIA<>1 THEN
PRINT:PRINT "No hay ganancia de pH"
END IF
GOTO PARAM

```

TOLEPH:

```

CLS
TOLPHO=TOLPH
IF OPCION=1 OR (OPCION=2 AND VARIA=1) THEN
PRINT USING "Actual: ###.## ":TOLPH
INPUT "Tolerancia para pH": TOLPH
IF TOLPH=0 THEN TOLPH=TOLPHO
END IF
IF OPCION=2 AND VARIA<>1 THEN
PRINT:PRINT "No hay tolerancia para pH"
END IF
GOTO PARAM

```

TCONPH:

```

CLS
DELTA20=DELTA2!
IF OPCION=1 OR (OPCION=2 AND VARIA=1) THEN
PRINT USING "Actual: ###.## seg.": DELTA2!
INPUT "Tiempo de Control": DELTA2!
IF DELTA2!=0 THEN DELTA2!=DELTA20!
END IF
IF OPCION=2 AND VARIA<>1 THEN
PRINT:PRINT "No hay Tiempo de Control para pH"
END IF
GOTO PARAM

```

DETENER:

```

REM'DENTRO DE LAS OPCIONES CUANDO EL SISTEMA SE HA DETENIDO MOMENTANEAMENTE
WINDOW 5,(165,100)-(370,300),2
CALL TEXTFACE (1)
PRINT
PRINT " EL SISTEMA SE HA DETENIDO"
PRINT
PRINT " MOMENTANEAMENTE"
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
r%(0)=175
r%(1)=5
r%(2)=190
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZE 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
CLS: WINDOW CLOSE 5
RETURN

```

REINICIAR:

```

REM'DENTRO DE LAS OPCIONES CUANDO EL SISTEMA SE QUIERE REINICIAR
BEEP
WINDOW 6,(165,100)-(370,300),2

```

```

CALL TEXTFACE (1)
PRINT " ¿ REALMENTE DESEA"
PRINT " REINICIAR ? "
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Reiniciar",(5,135)-(200,150),1
BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
    r%(0)=175
    r%(1)=5
    r%(2)=190
    r%(3)=200
    InSetRect r%(0),-4,-4
    PENSIZE 3,3
    FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
    PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
    DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
    INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
    BOTON=DIALOG(1)
    IF BOTON=1 THEN CLEAR:CLS:GOTO START2
    IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS :WINDOW CLOSE 6
    RETURN

TERMINAR:
REM'DENTRO DE LAS OPCIONES CUANDO EL SISTEMA SE TERMINA
BEEP
WINDOW 7,.(165,100)-(370,300),2
PRINT
CALL TEXTFACE (1)
PRINT " ¿ REALMENTE DESEA"
PRINT " TERMINAR ? "
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Terminar",(5,135)-(200,150),1
BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
    r%(0)=175
    r%(1)=5
    r%(2)=190
    r%(3)=200
    InSetRect r%(0),-4,-4
    PENSIZE 3,3
    FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
    PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
    DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
    INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
    BOTON=DIALOG(1)
    IF BOTON=1 THEN SYSTEM
    IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS :WINDOW CLOSE 7
    RETURN

EXTRA:
REM'CUANDO LA FERMENTACION HA TERMINADO Y SE QUIERE AGREGAR TIEMPO DE MAS
WINDOW 8,.(165,100)-(370,300),2
PRINT " TIEMPO ADICIONAL DE "
PRINT " FERMENTACION (seg)"
PRINT USING "(No Exceder de ####.## Hrs.):"TFH
INPUT TA
TFS = (TFH*3600) + TA
TFH = TFH + (TA/3600)
NP = TFS,TI
CTE = TRH
CON1 = 1
CON2 = 1
CALL PANTALLA
WINDOW CLOSE 8
GOTO INICIO

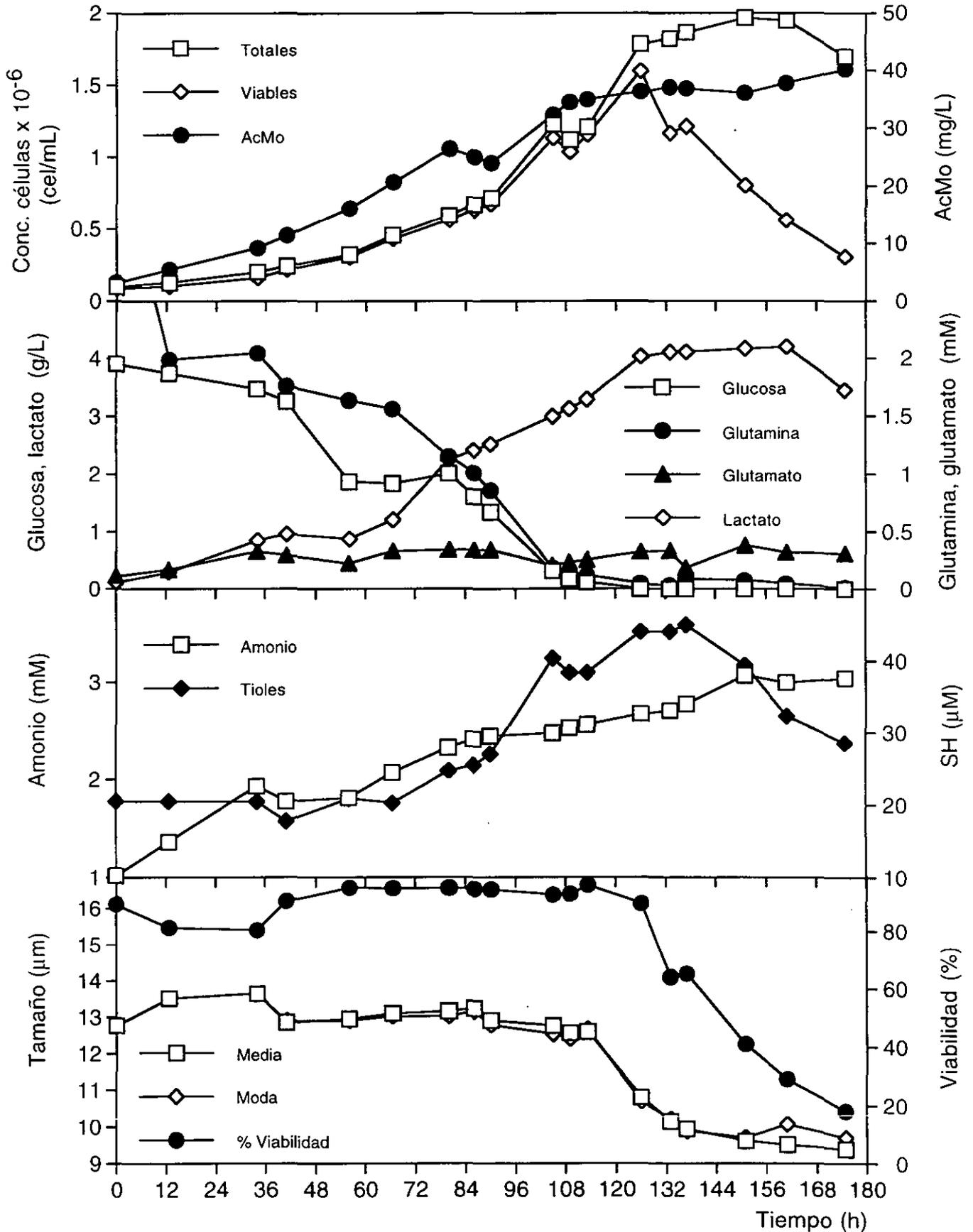
PANT.
REM'PANTALLA AL INICIO DE LA CORRIDA Y DE REGISTRO DE LA FERMENTACION
SUB PANTALLA STATIC
WINDOW 2,.(0,20)-(530,385)
CALL TEXTFONT (0)
CALL TEXTSIZE (14)
CALL TEXTFACE (65)
FORECOLOR 409
LOCATE 1,4: PRINT " UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO"
LOCATE 2,11: PRINT "INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA"
LOCATE 3,9: PRINT "DEPARTAMENTO DE BIOINGENIERIA"
FORECOLOR 23
    CALL PENSIZE (3,3)
    CALL MOVETO (10,55): CALL LINETO (500,55): CALL LINETO (500,350): CALL LINETO
(10,350): CALL LINETO (10,55)
    CALL MOVETO (245,55): CALL LINETO (245,350)
    CALL MOVETO (10,202): CALL LINETO (500,202)
    CALL PENSIZE (2,2)
    CALL MOVETO (28,70):CALL LINETO (28,185):CALL LINETO(235,185)
    CALL MOVETO (264,70):CALL LINETO (264,185):CALL LINETO(490,185)
    CALL MOVETO (28,217):CALL LINETO (28,332):CALL LINETO(235,332)

```

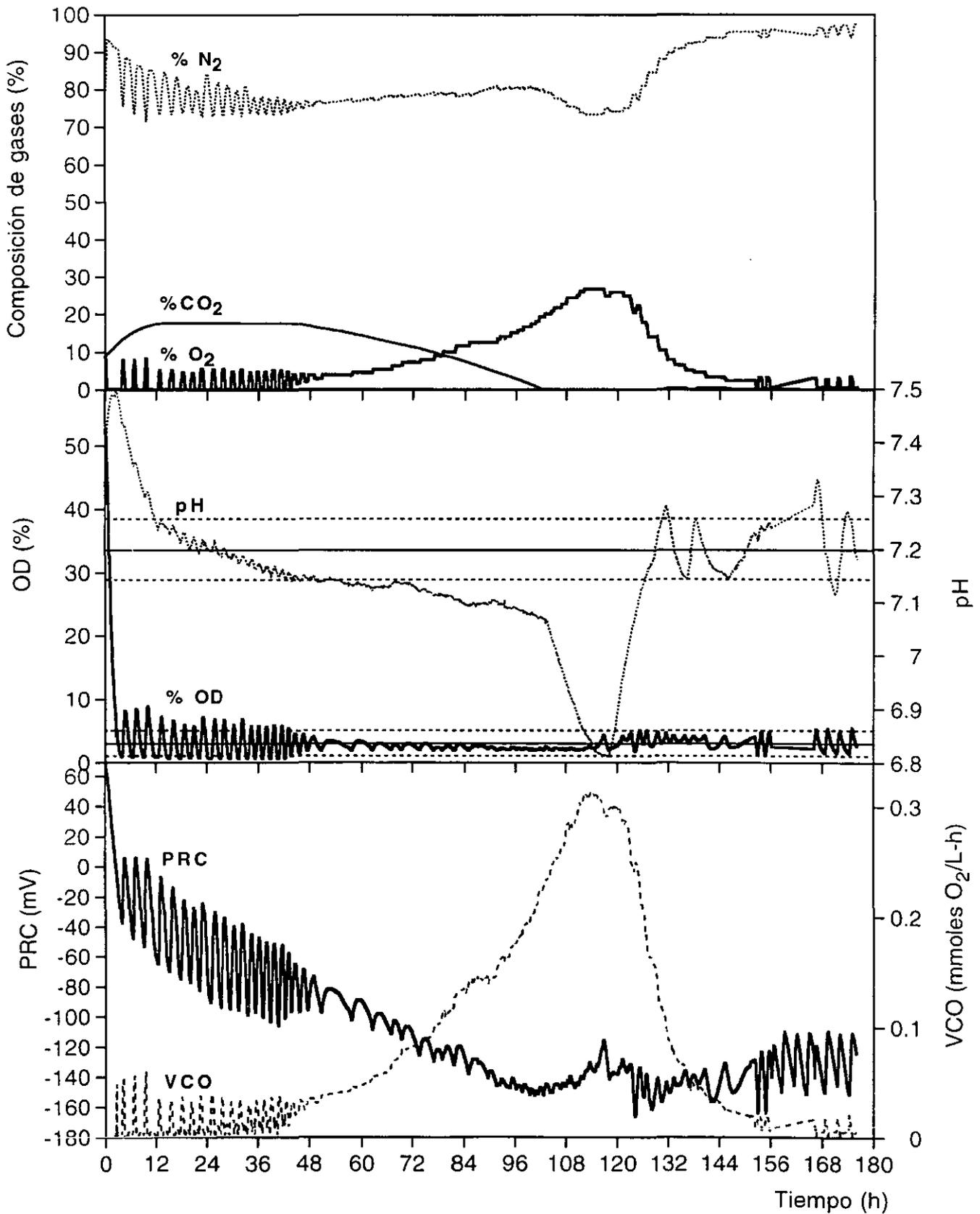
APENDICE C

Gráficas de las cinéticas a PRC y OD controlados

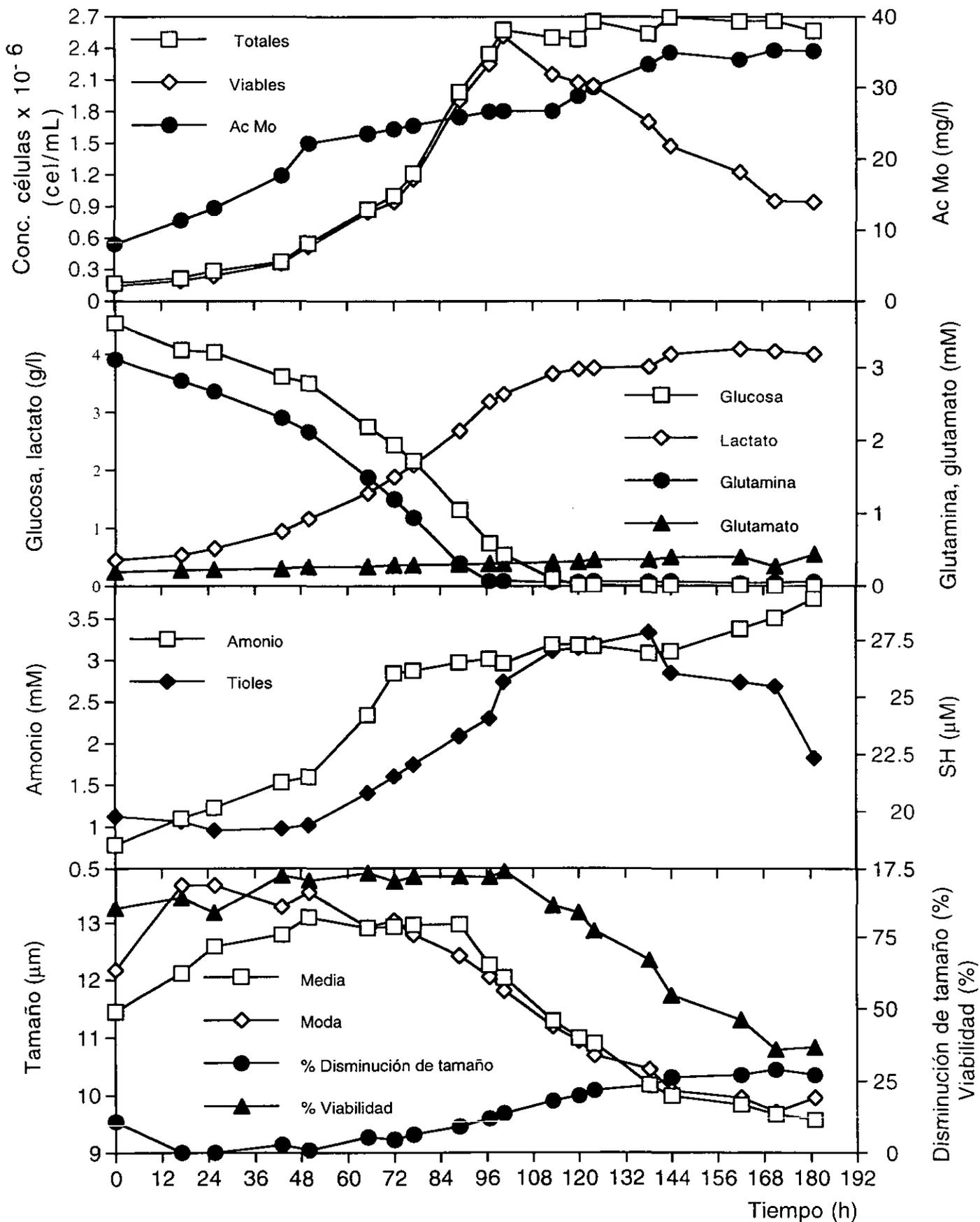
F21. Control a 3% OD y pH 7.2



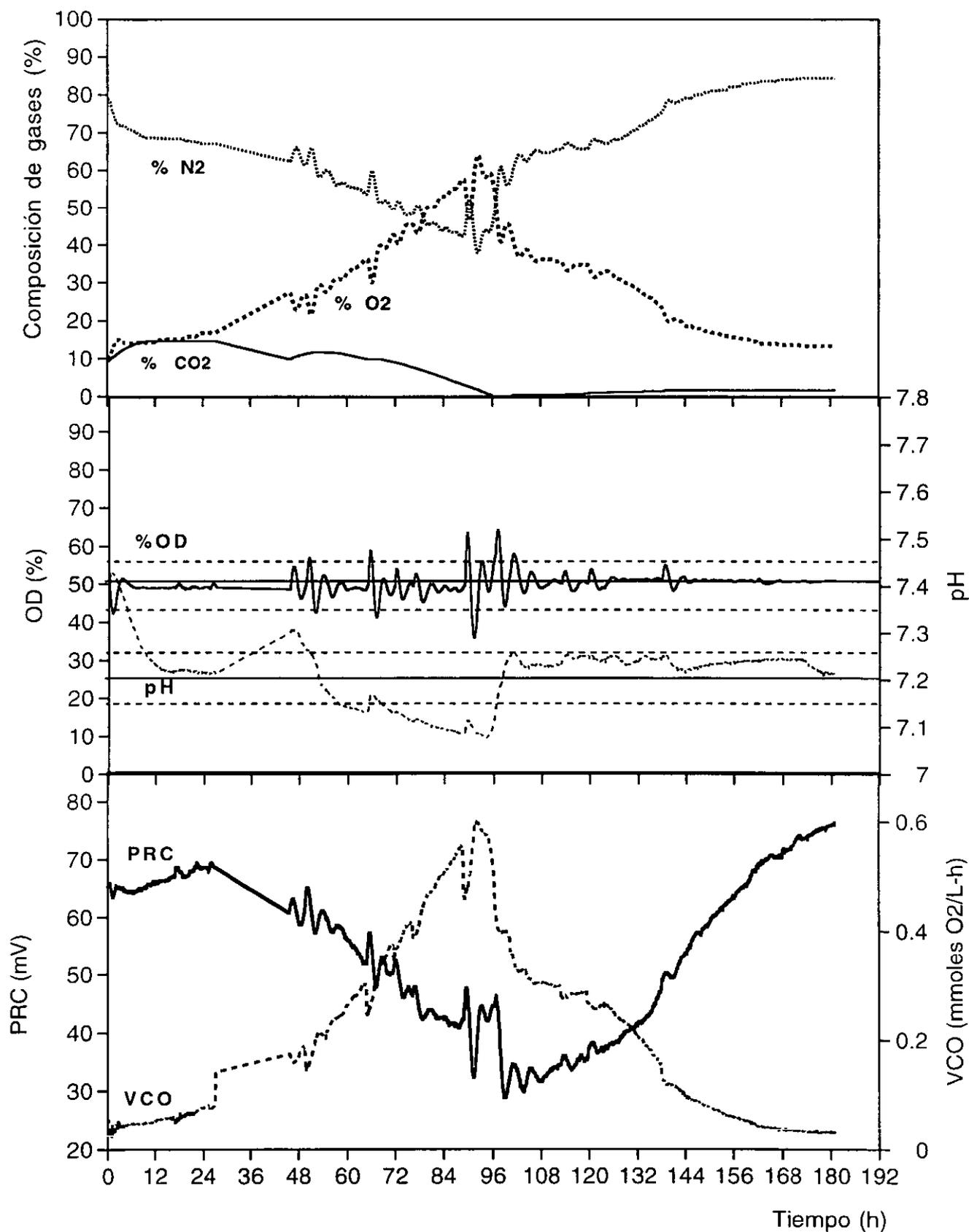
F21. Control a 3% OD y pH 7.2



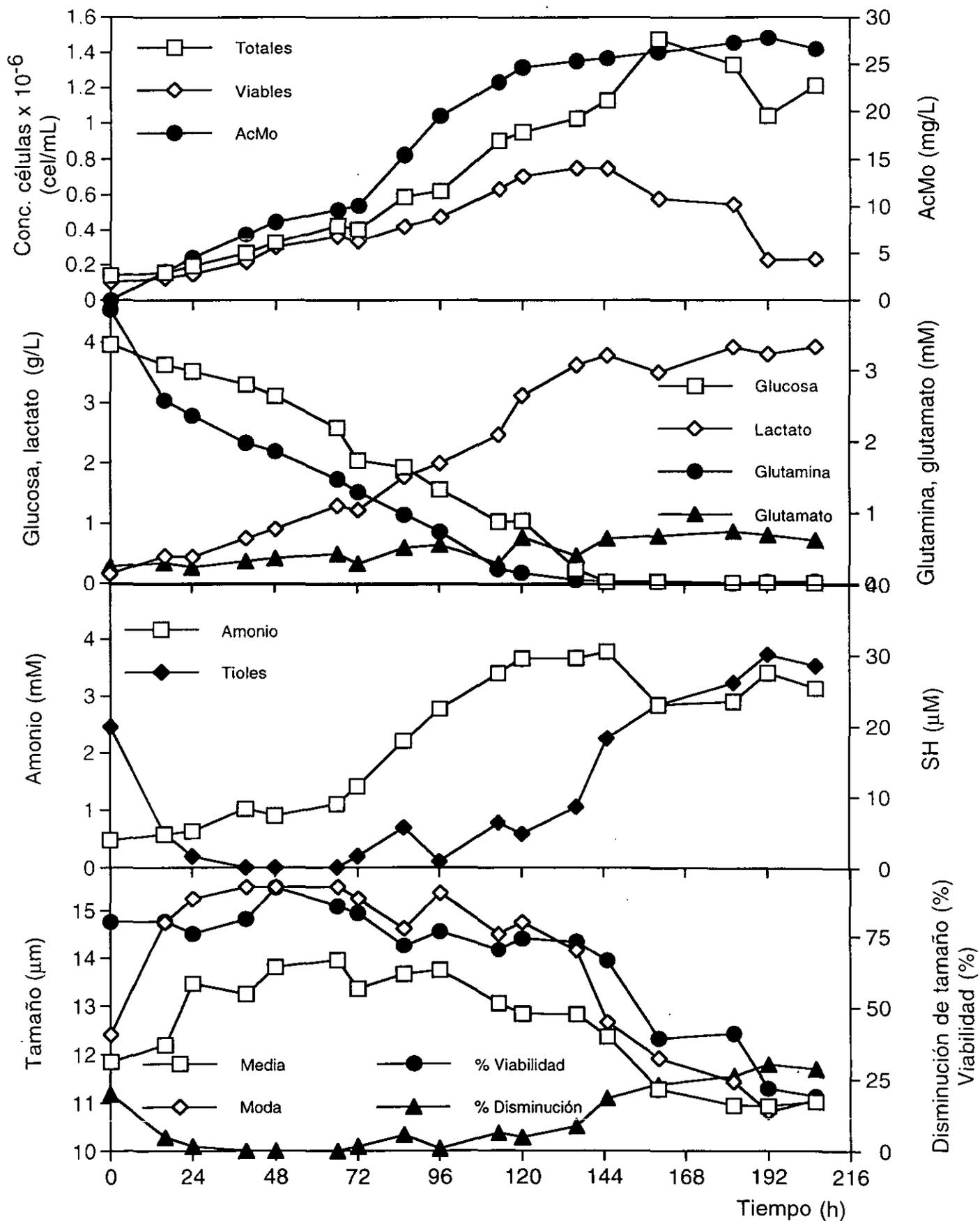
F17. Control a 50% OD y pH 7.2



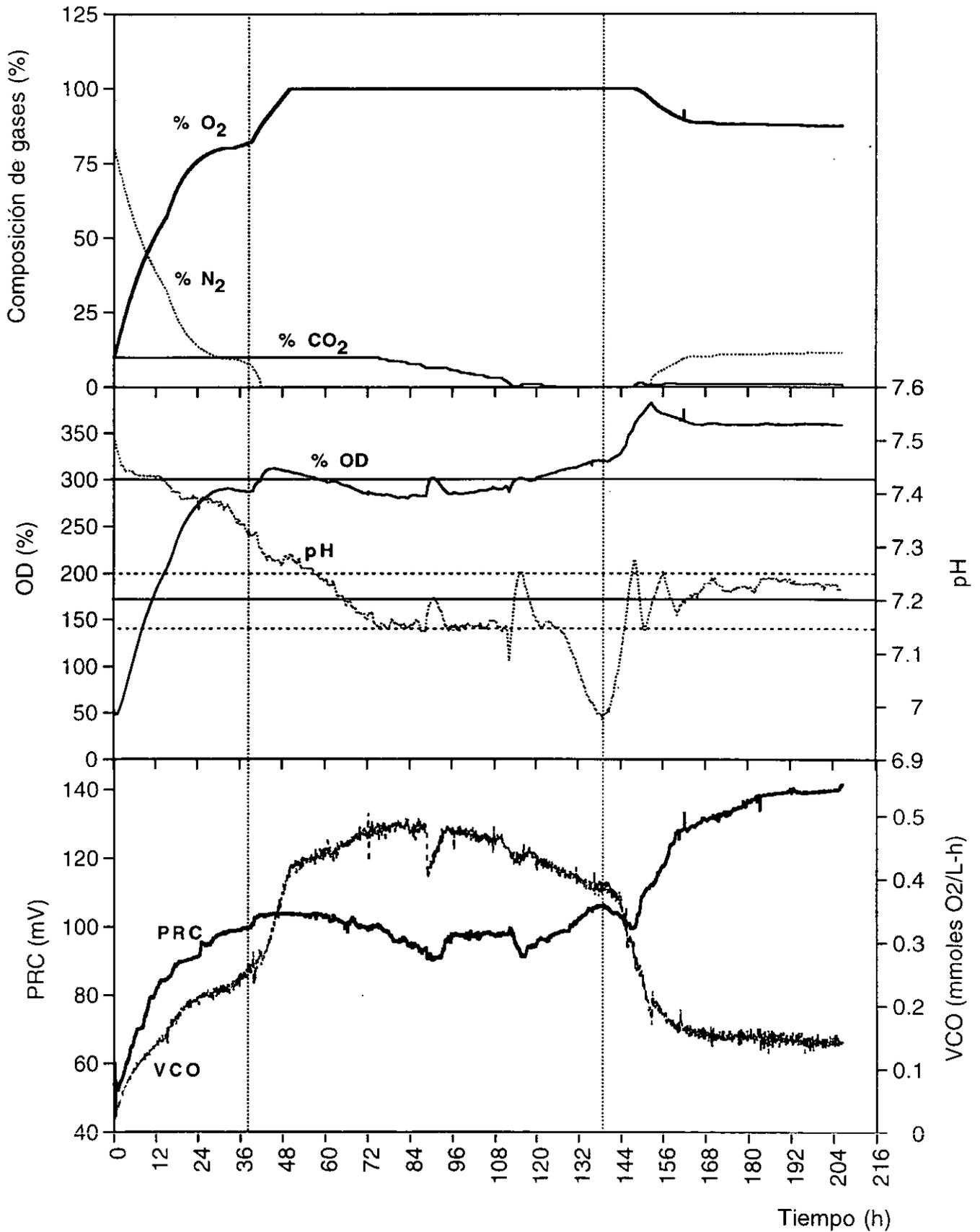
F17. Control a 50% OD y pH 7.2



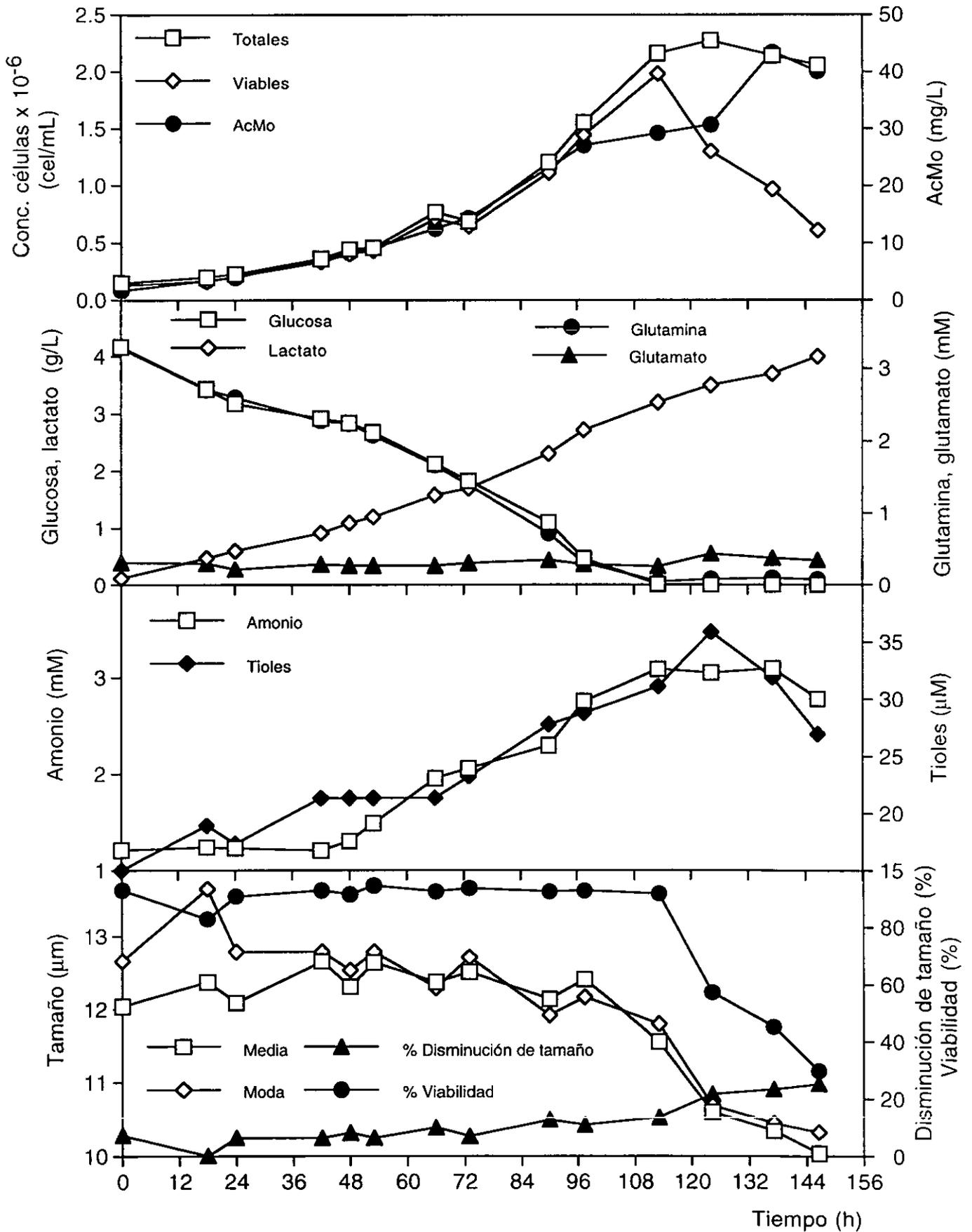
F20. Control a 300% OD y pH 7.2



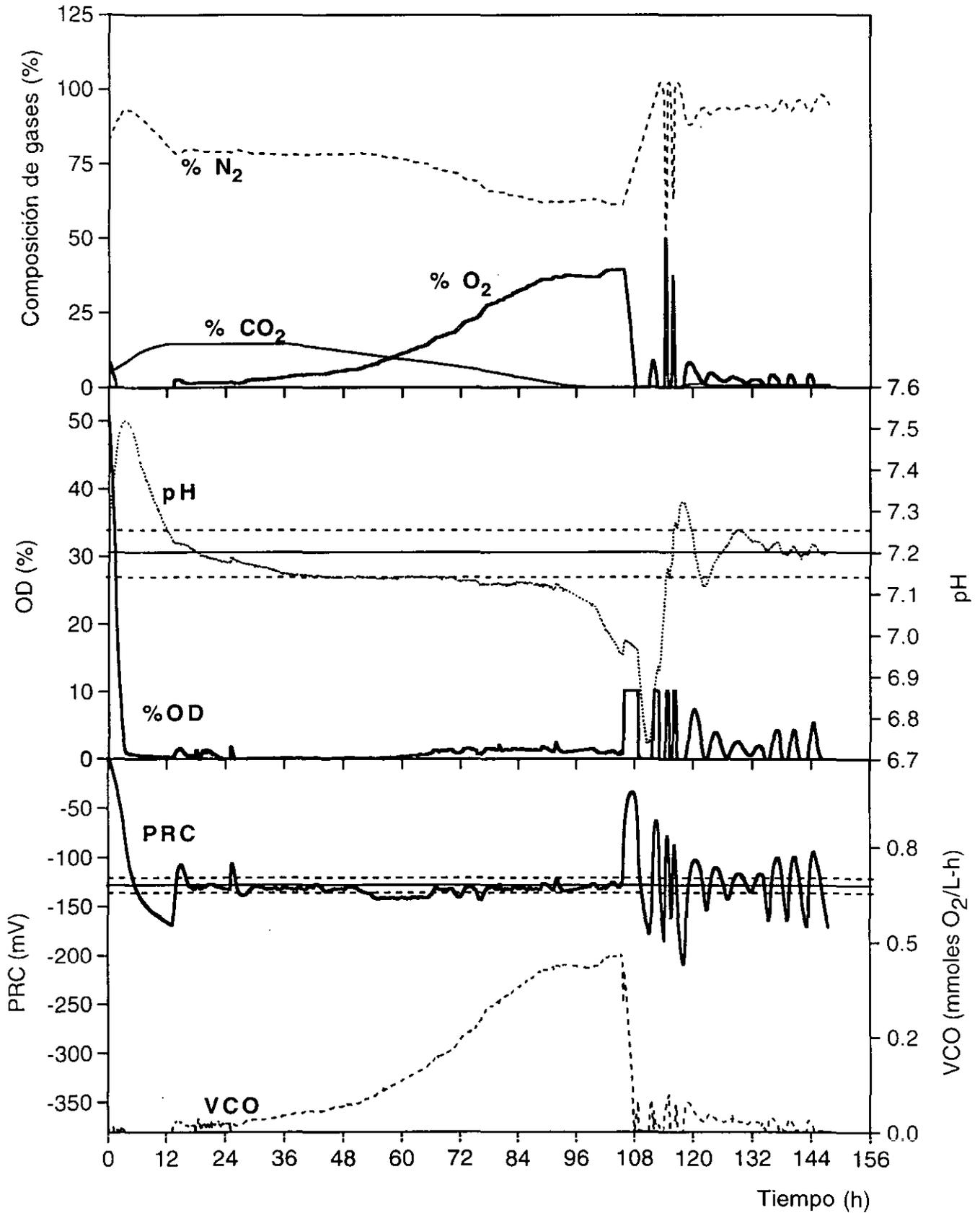
F20. Control a 300% OD y pH 7.2



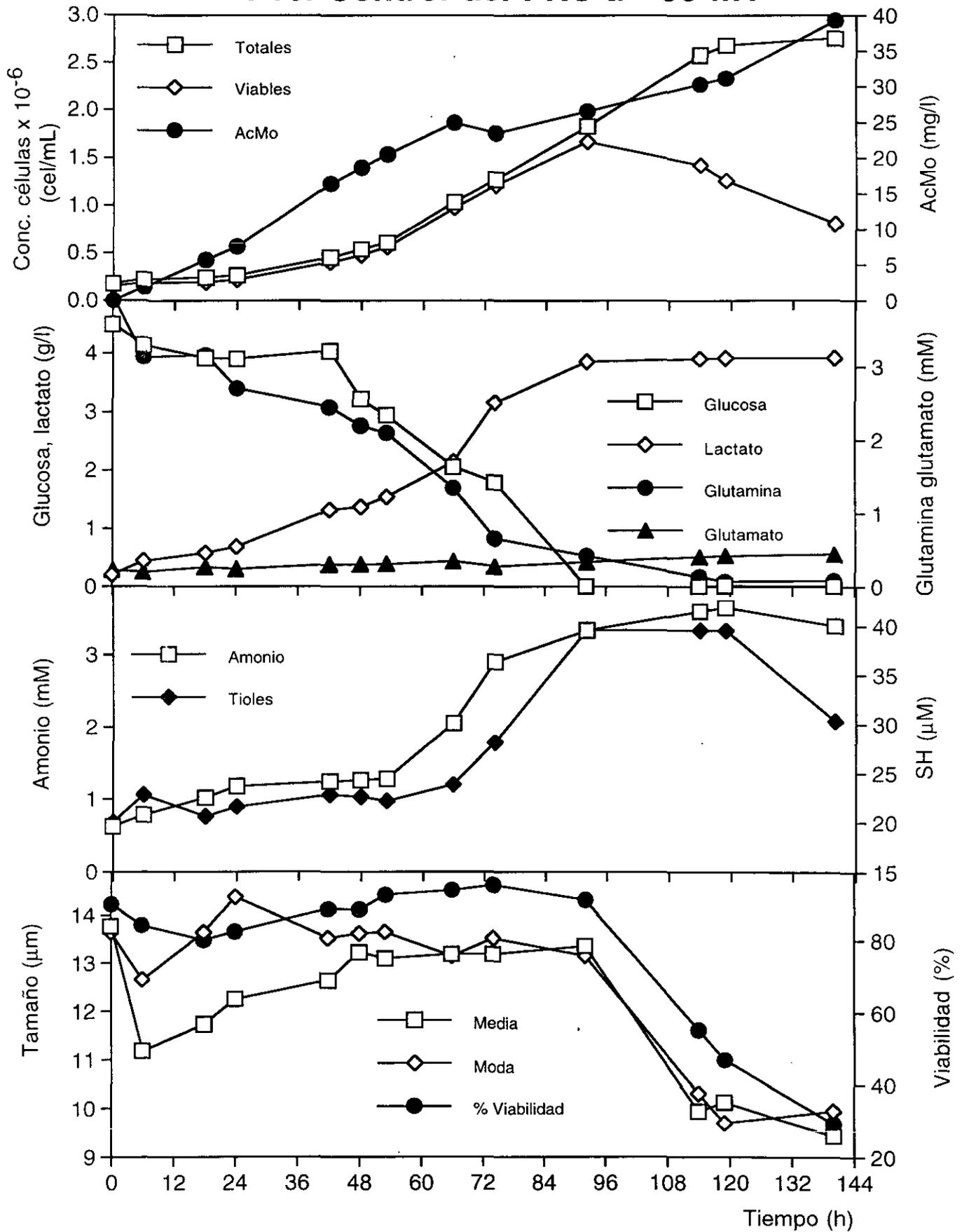
F22. Control del PRC a -133 mV



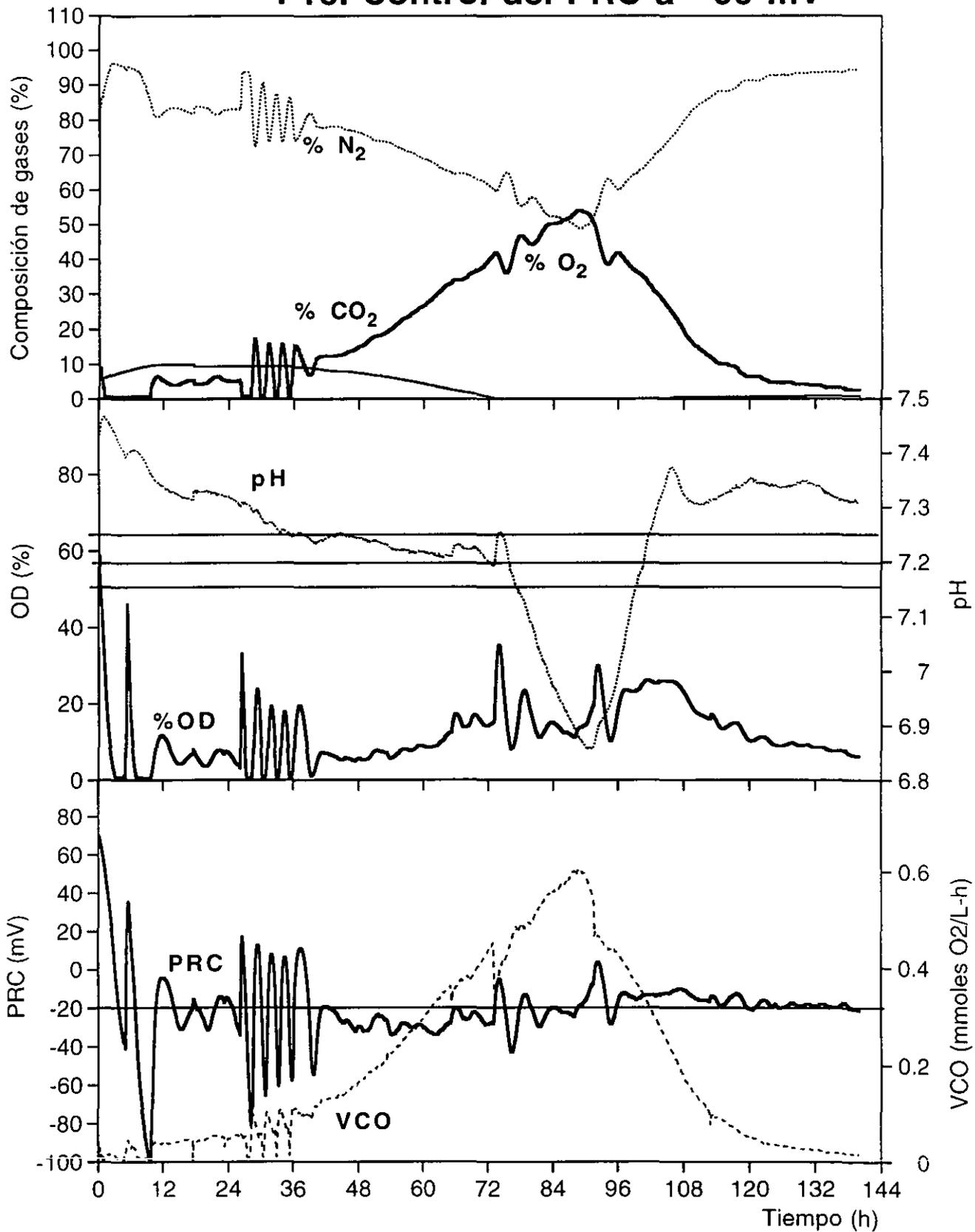
F22.- Control del PRC a -133 mV



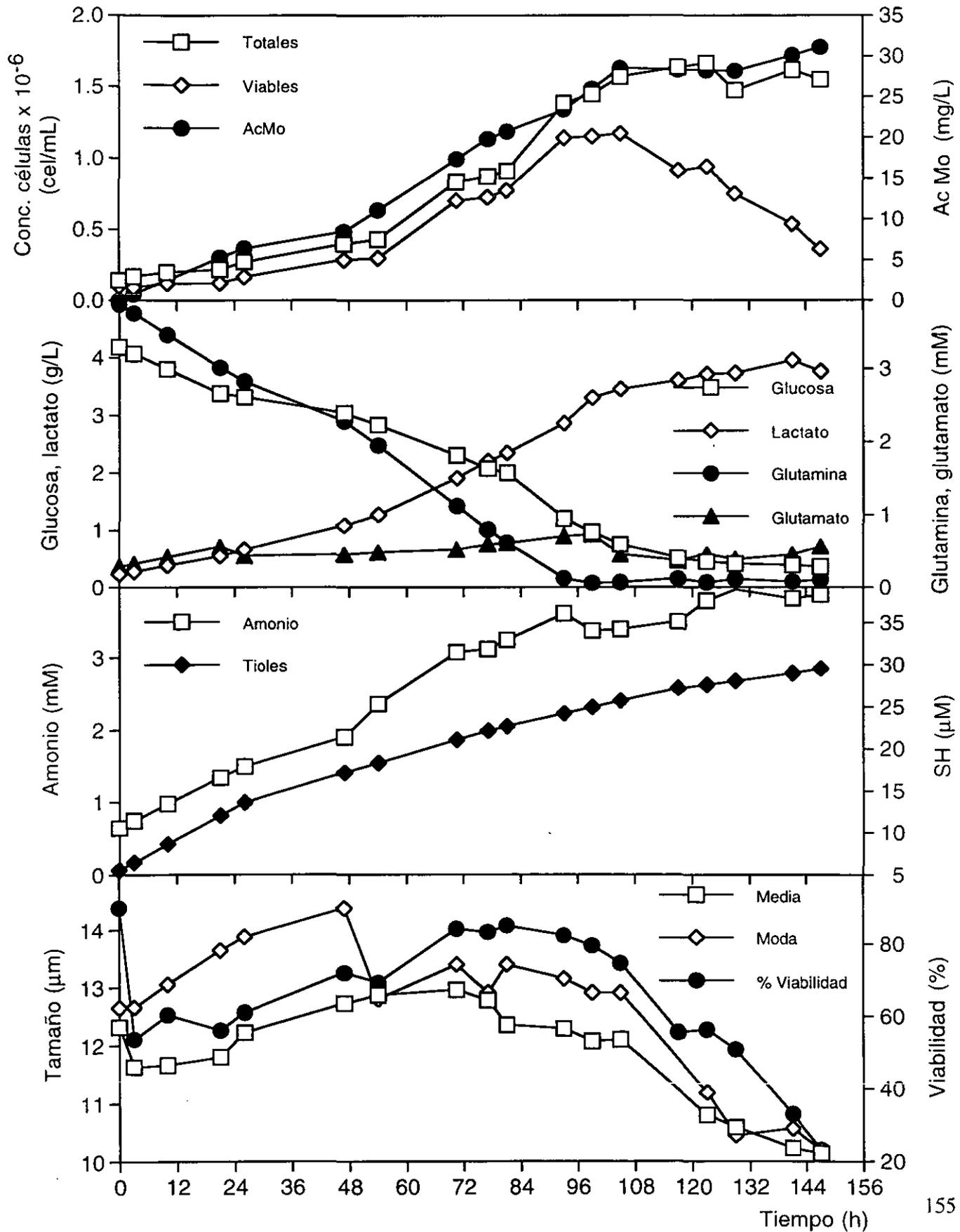
F16. Control del PRC a -90 mV



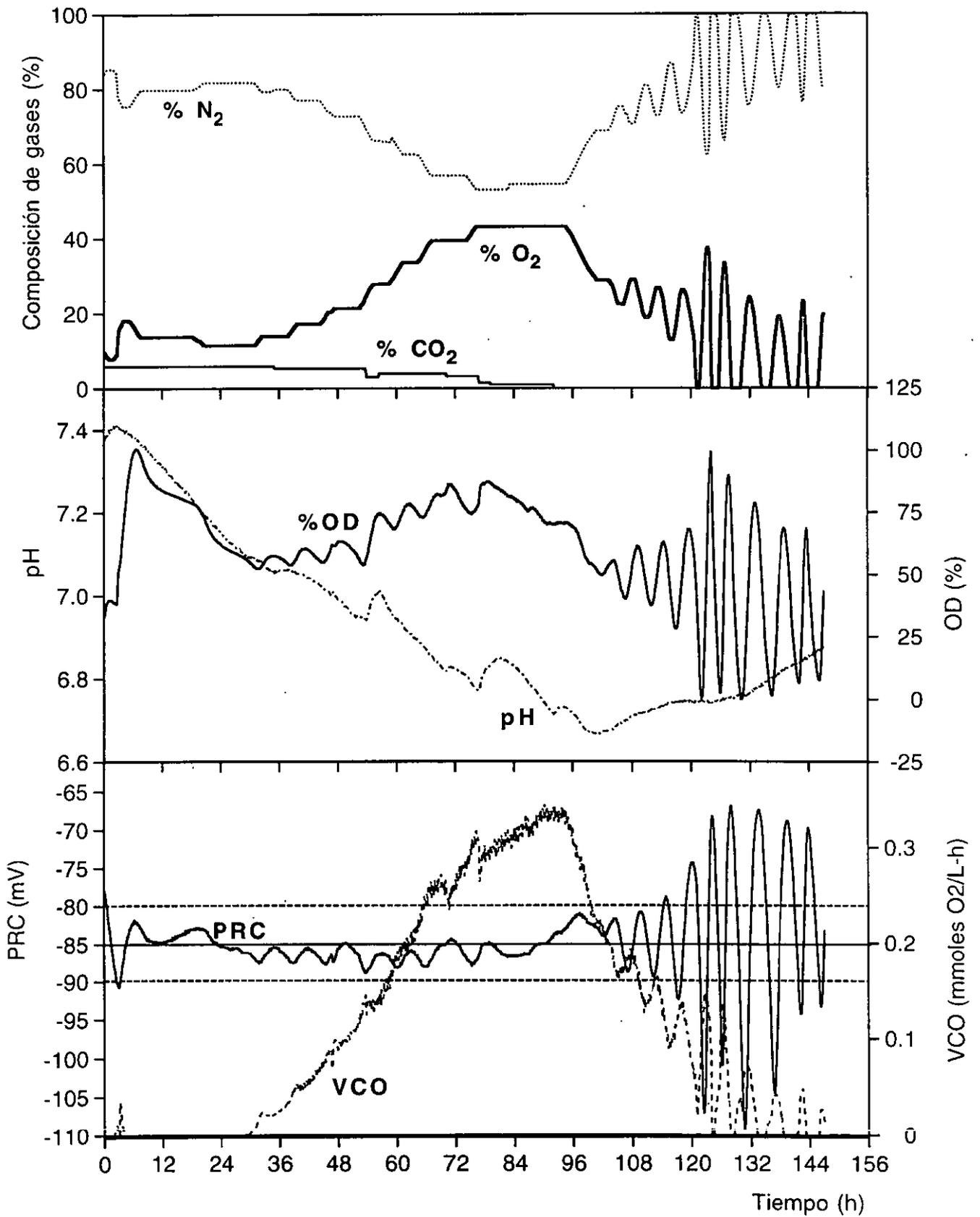
F16. Control del PRC a -90 mV



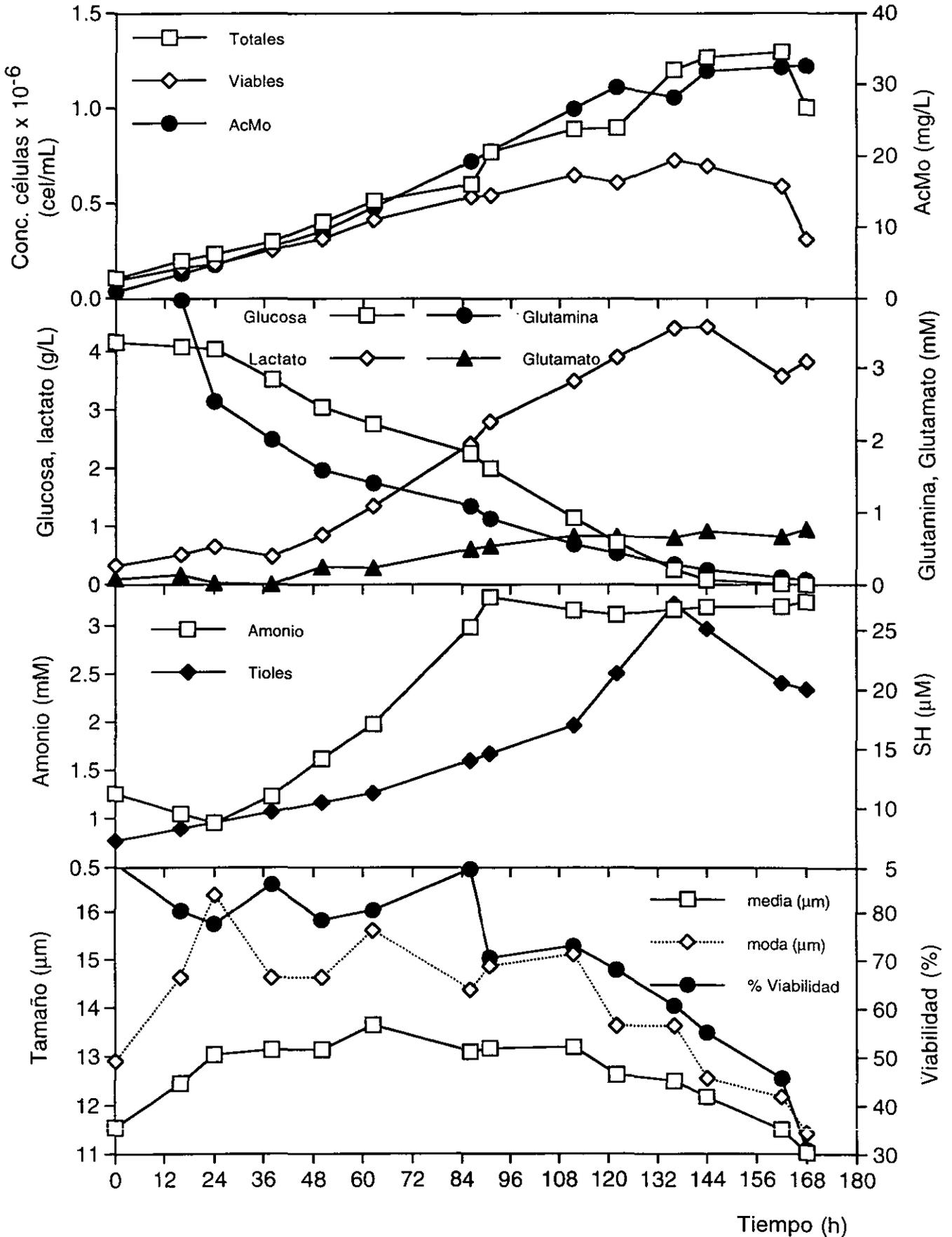
F8. Control del PRC a -7 mV



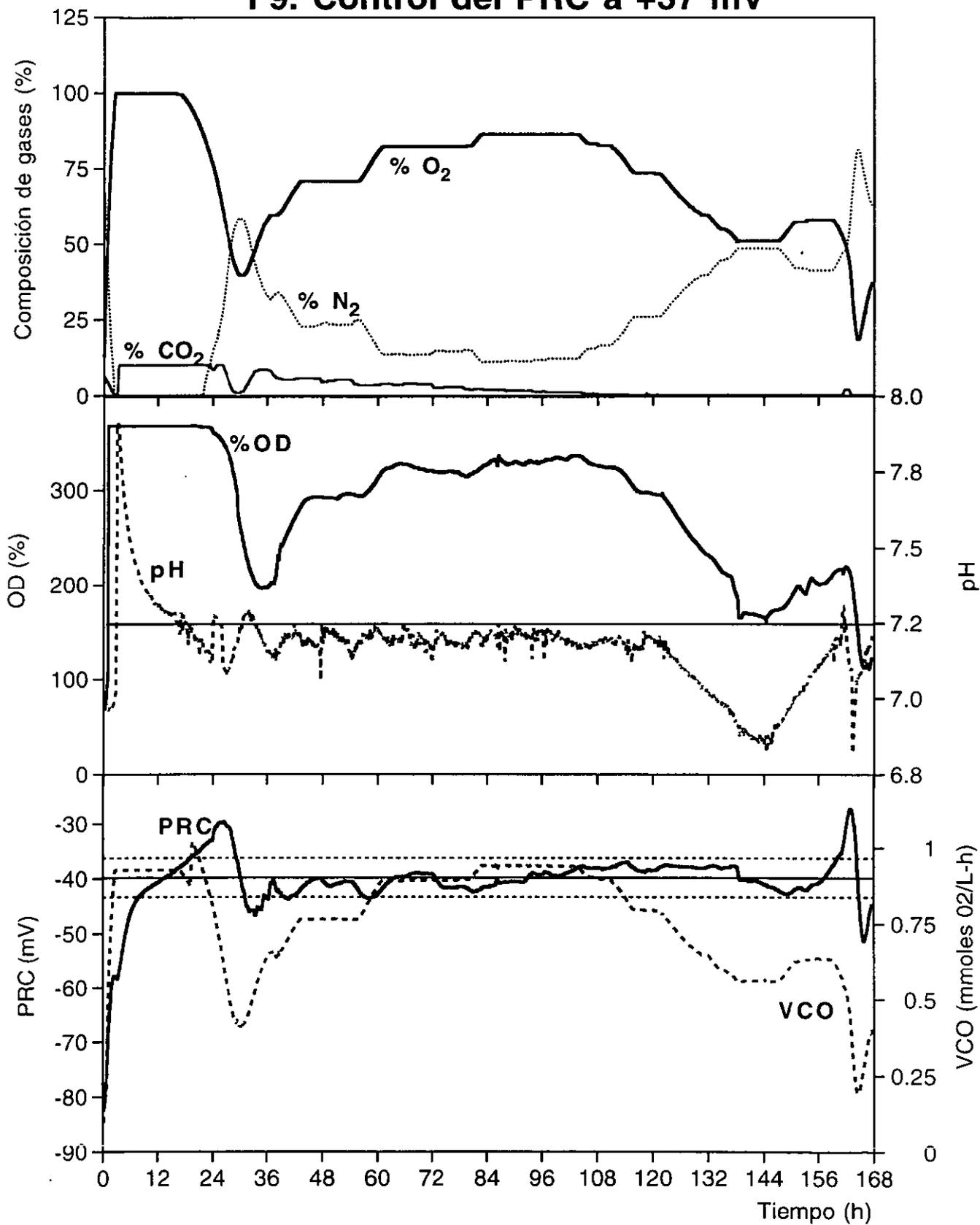
F8. Control del PRC a -7 mV



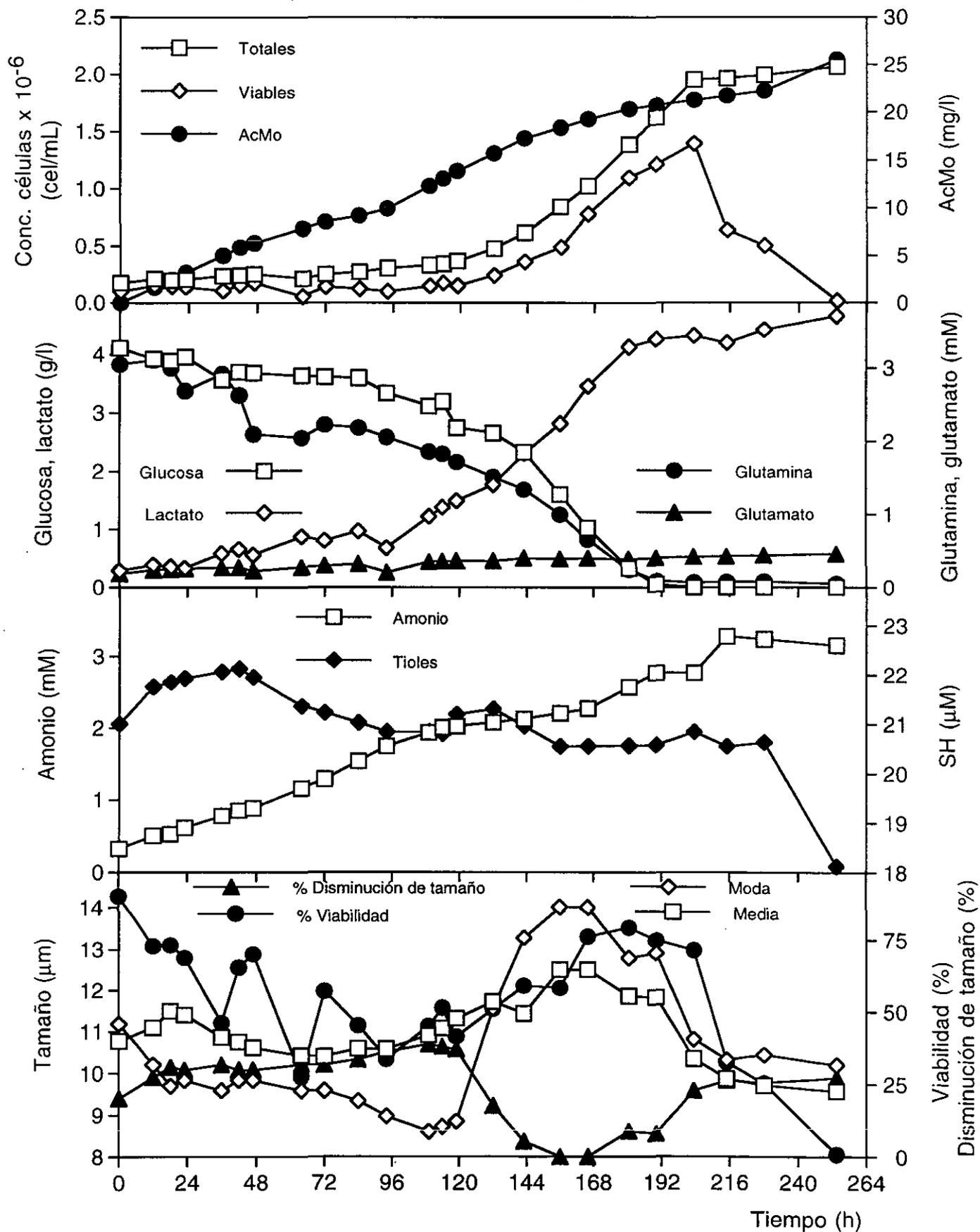
F9. Control del PRC a +37 mV



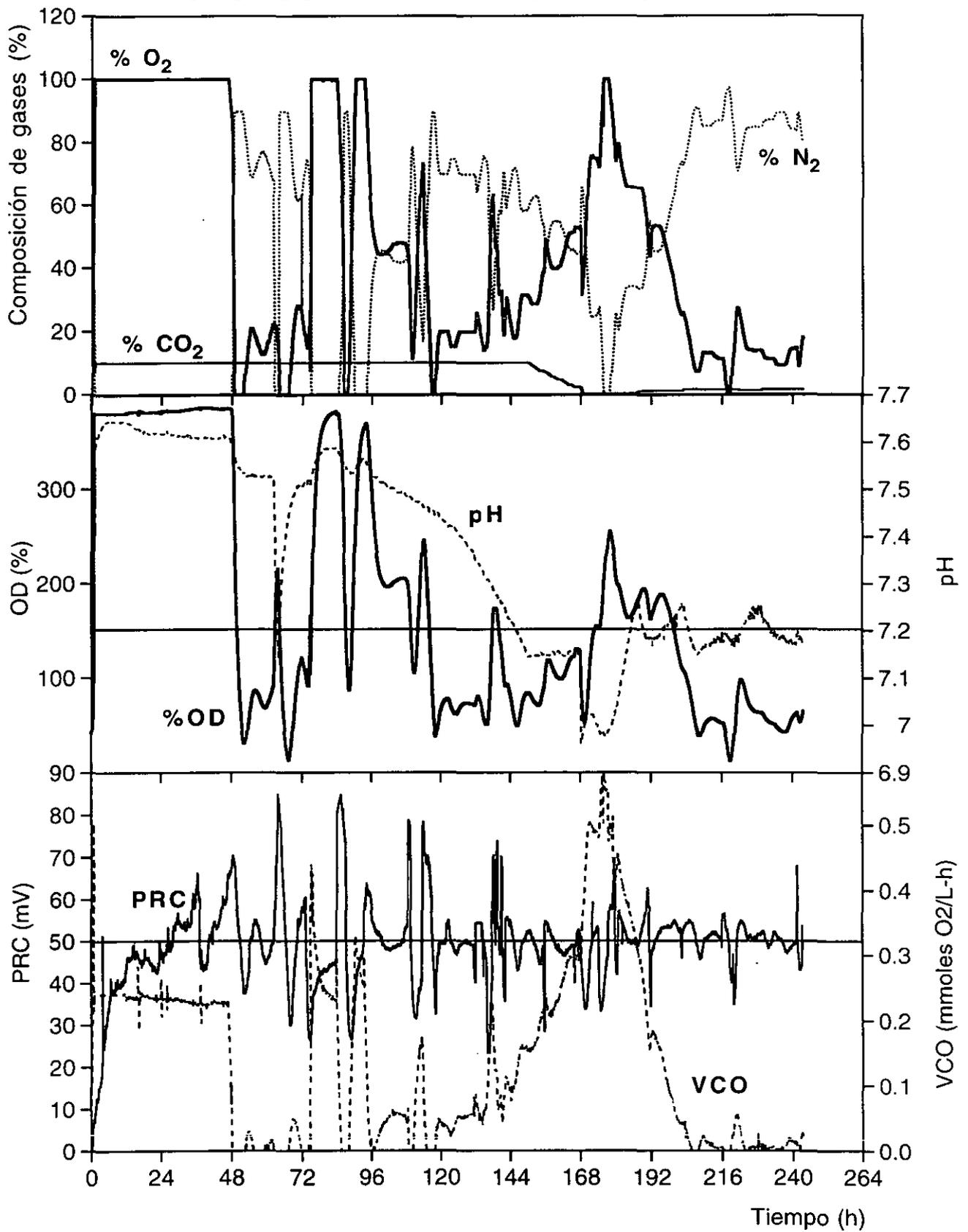
F9. Control del PRC a +37 mV



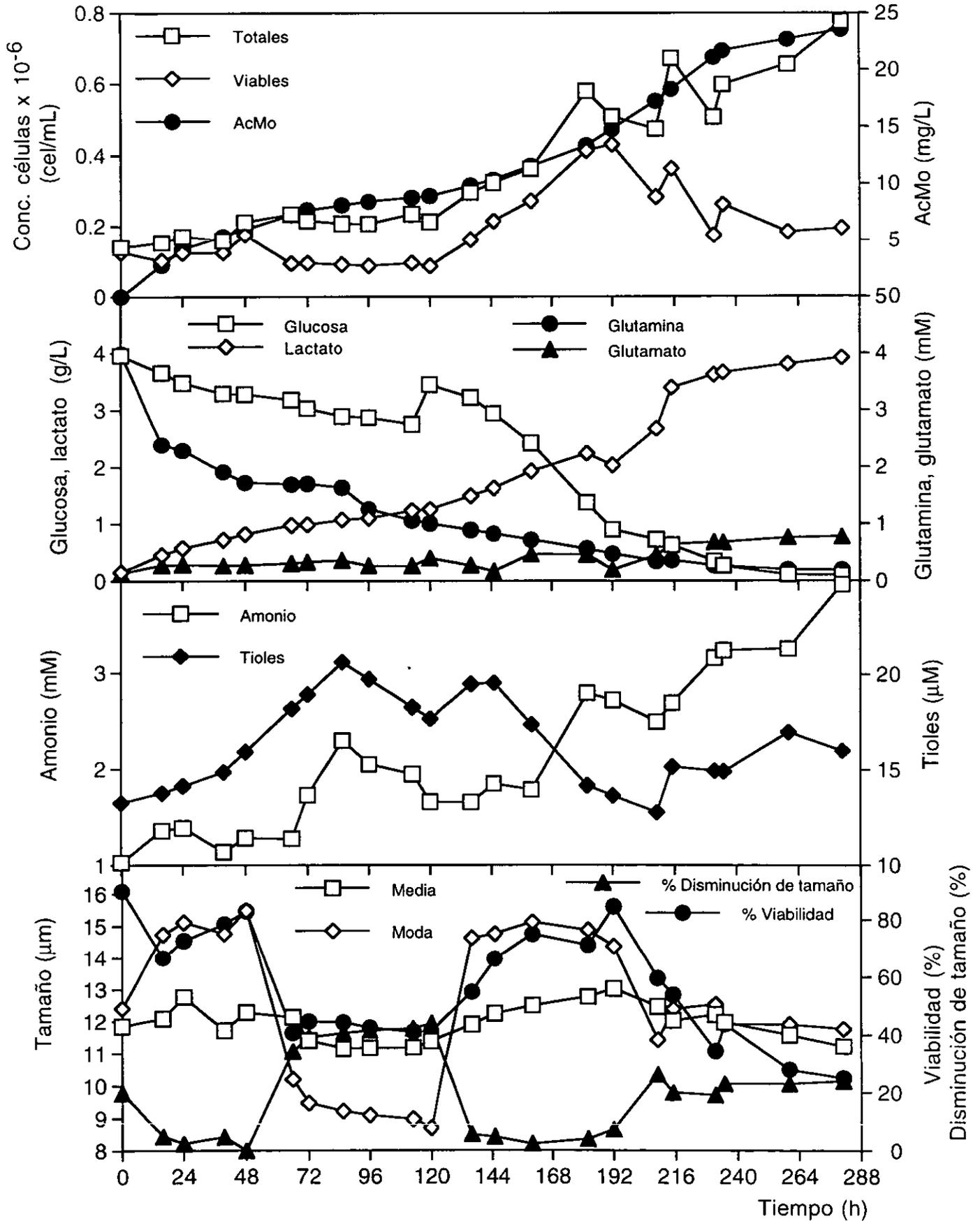
F13. Control del PRC a +50 mV



F13. Control del PRC a +50 mV.



F19. Control del PRC a + 90 mV



F19. Control del PRC a +90 mV

