

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS DE LA LINEA CELULAR  
DE LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA DE HUMANO (REH) EN UN  
BIORREACTOR SPINNER DE 250 MILILITROS**

MARIA ALEJANDRA MENDIETA RODRIGUEZ  
JOHAN RICARDO SANCHEZ ZAPATA

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ  
2019

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS DE LA LINEA CELULAR  
DE LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA DE HUMANO (REH) EN UN  
BIORREACTOR SPINNER DE 250 MILILITROS**

MARIA ALEJANDRA MENDIETA RODRIGUEZ  
JOHAN RICARDO SANCHEZ ZAPATA

Proyecto integral de grado para optar al título de  
INGENIERO QUÍMICO

Director  
Dr. Dionisio Humberto Malagón Romero  
Ing. Qco, Ph.D. Ingeniería Química

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ  
2019

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

Nubia Liliana Becerra Ospina

---

Diana Milena Morales Fonseca

Bogotá D.C.: Agosto de 2019

## **DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

**Dr. MARIO POSADA GARCIA PEÑA**

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCIA-PEÑA**

Vicerrectora Académica y de Posgrados

**Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS**

Decano General de Facultad de Ingenierías

**Dr. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI**

Director Programa de Ingeniería Química

**Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIERREZ**

Las Directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente al autor.

*Agradezco primero que nada a Dios por guiar mi camino, por permitirme culminar esta etapa tan importante en mi vida, porque en momentos difíciles siempre encuentro en él la tranquilidad suficiente para llenarme de fuerza y seguir adelante.*

*A mis padres Wilson Mendieta y Diana Rodriguez porque siempre sin importar nada creyeron en mi potencial y han sido un gran apoyo y gran ejemplo a seguir, porque el aporte de cada uno en este proceso fue esencial para llegar hasta donde estoy y ser quien soy, por el esfuerzo tan grande que hicieron siempre para darme lo mejor y hacer mis sueños realidad.*

*A mi hermano Sebastián porque me dio la fuerza necesaria para sacar este proyecto adelante, porque siempre estuvo para mí incondicionalmente brindándome su compañía en todo momento.*

*A mis abuelos Jaime Rodriguez y María Eugenia Rodriguez porque siempre estuvieron presentes en cada etapa de mi vida y me brindaron su apoyo y amor incondicional, sin duda alguna se merecen este triunfo.*

*A cada una de mis amigas que me alentaron a continuar en el desarrollo de mi vida estudiantil que hoy termina para comenzar esta nueva etapa en mi vida. Los amo inmensamente y me siento muy afortunada de tenerlos en mi vida. Esto es por y para ustedes.*

**María Alejandra Mendieta Rodriguez**

*Gracias a Dios en primer lugar, por ser quien de su mano me ha guiado en cada etapa de mi vida, por darme la tranquilidad en los momentos difíciles y por ser un gran apoyo siempre y en todo lugar.*

*A mi familia y amigos, quienes durante el desarrollo del proyecto estuvieron pendientes de mí, dándome su apoyo y palabras de aliento.*

*Finalmente, a mis padres Omaira Zapata y Ricardo Sánchez, quienes son un ejemplo a seguir, dándome su constante apoyo y llenándome de buenas energías cada vez que lo necesité durante el desarrollo de este proyecto y durante toda mi vida. Gracias por su amor, reflejado en la paciencia, entendimiento y ayuda que brindaron en esta etapa de crecimiento personal y profesional, este logro también es de ustedes.*

*Son los mejores. Los amo.*

**Johan Ricardo Sánchez Zapata**

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a:

Ingeniero químico, Dr. Dionisio Humberto Malagón Romero por constante ayuda, orientación, correcciones e interés en este proyecto.

Ingeniera química, Elizabeth Torres Gámez, Asesora de Proyecto de Grado en la Universidad de América por su orientación y apoyo durante todo el desarrollo del proyecto.

A la Universidad de América, sus Directivos y Docentes por sus conocimientos impartidos, su experiencia y dedicación a la formación profesional.

Laboratorio de biología molecular de virus de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, por la financiación de este proyecto, y el suministro de todos los implementos necesarios para llevarlo a cabo.

A todo el personal que labora en el Laboratorio de Biología Molecular de virus de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá por su colaboración y amabilidad durante el desarrollo del proyecto.

Y finalmente, a todas las personas que estuvieron presentes durante la ejecución de este trabajo de grado.

## CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	19
OBJETIVOS	22
1. GENERALIDADES	23
1.1 CÁNCER	23
1.1.1 Causas.	23
1.1.2 Tratamiento	24
1.2 VIRUS ONCOLÍTICO	25
1.3 CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES	27
1.3.1 Clasificación del cultivo celular.	29
1.3.1.1 Cultivos en monocapa.	30
1.3.1.2 Crecimiento en suspensión.	30
1.3.1.3 Cultivos tridimensionales.	30
1.3.1.4 Líneas Celulares.	31
1.3.1.5 Cultivos primarios.	31
1.3.2 Tipos de cultivos de tejidos.	31
1.3.2.1 Cultivo de Órganos.	32
1.3.2.2 Explantes primarios.	32
1.3.2.3 Cultivo Celular.	32
1.4 CULTIVOS DE CÉLULAS EN UN BIORREACTOR	33
1.4.1 Biorreactor spinner.	35
1.4.2 Variables que deben ser monitoreadas durante el proceso del cultivo de las células eucariotas en biorreactores.	36
1.4.2.1 Temperatura.	36
1.4.2.2 pH.	37
1.4.2.3 Oxígeno.	37
1.4.2.4 Agitación.	38
1.4.2.5 Medio de cultivo.	38
1.4.3 Ventajas y desventajas del cultivo celular en biorreactores.	39
1.5 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR ESPECTROFOTOMETRÍA (Método DNS)	39
1.5.1 Glucosa.	40
1.5.2 Azúcares reductores.	40
1.6 ESCALAMIENTO	40
1.6.1 Factor de escala.	42
1.6.2 Parámetros de escalamiento.	42
2. METODOLOGIA	44
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.1.1 Materiales y reactivos	44
2.1.1.1 Células REH.	44

2.1.1.2 Medio RPMI 1640.	45
2.1.2 Equipos	45
2.1.2.1 Microplacas.	45
2.1.2.2 Biorreactor Spinner de 250 mL.	46
2.1.3 Métodos	47
2.1.3.1 Cultivo, pasaje celular y descongelamiento.	48
2.1.3.2 Cultivo celular en microplaca.	48
2.1.3.3 Cultivo celular en caja de Petri.	49
2.1.3.4 Cultivo celular en biorreactor Spinner de 250mL.	50
2.2 CARACTERIZACION	51
2.2.1 Recuento Celular.	51
2.2.2 Cuantificación Celular.	54
2.2.3 Cuantificación de glucosa.	55
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	57
3.1 CULTIVO EN MICROPLACAS DE 24 POZOS	57
3.1.1 Cinética y viabilidad celular.	57
3.2 CULTIVO EN CAJA DE PETRI	62
3.2.1 Cinética y viabilidad celular	62
3.3 CULTIVO EN BIORREACTOR SPINNER DE 100ML	65
3.4 CULTIVO EN BIORREACTOR SPINNER DE 250 ML	66
3.4.1 Cinética y viabilidad celular.	66
3.4.2 Consumo de glucosa.	69
3.5 SIMULACION DE UN BIORREACTOR	72
3.5.1 Parámetros cinéticos para el crecimiento de células.	73
3.5.2 Parámetros cinéticos para el sustrato.	76
3.5.2.1 Cálculo de la tasa de rendimiento de sustrato/biomasa.	77
3.5.3 Simulación en MATLAB de un biorreactor.	78
4. CONCLUSIONES	82
5. RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFIA	84
ANEXOS	90

## LISTA DE ECUACIONES

	pág.
<b>Ecuación 1.</b> Recuento celular.	53
<b>Ecuación 2.</b> Concentración de células viables.	54
<b>Ecuación 3.</b> Velocidad específica de crecimiento.	54
<b>Ecuación 4.</b> Tiempo de duplicación.	54
<b>Ecuación 5.</b> Ecuación de la recta.	55
<b>Ecuación 6.</b> Velocidad de generación de las células.	72
<b>Ecuación 7.</b> Velocidad de consumo de sustrato.	73
<b>Ecuación 8.</b> Ecuación de Monod.	73
<b>Ecuación 9.</b> Ecuación de Monod reducida.	74
<b>Ecuación 10.</b> Linealización de Langmuir.	74
<b>Ecuación 11.</b> Ecuación derivada.	75
<b>Ecuación 12.</b> Velocidad de consumo de sustrato.	77

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Virus Oncolítico.	27
<b>Figura 2.</b> Cultivo de células animales distribuidas en cajas de Petri, frascos flask de 25 y 75 mL dentro de una incubadora.	29
<b>Figura 3.</b> Tipos de crecimiento de los cultivos celulares.	30
<b>Figura 4.</b> Tipos de cultivos de tejidos.	32
<b>Figura 5.</b> Cultivo de células distribuidas en cajas de Petri y en frascos flask dentro de una incubadora.	34
<b>Figura 6.</b> Biorreactores spinner (Corning) de 250 y 1000 mL.	36
<b>Figura 7.</b> Células REH vistas desde el microscopio.	44
<b>Figura 8.</b> Microplacas de 6, 12, 24, 48 y 96 pozos.	45
<b>Figura 9.</b> Biorreactor spinner 250 mL dentro de la cabina de flujo laminar.	46
<b>Figura 10.</b> Diagrama de la metodología.	47
<b>Figura 11.</b> Metodología del cultivo celular en microplaca.	49
<b>Figura 12.</b> Metodología del cultivo celular en cajas de Petri.	50
<b>Figura 13.</b> Metodología del cultivo celular en biorreactor spinner.	51
<b>Figura 14.</b> Cámara de Neubauer.	52
<b>Figura 15.</b> Reglilla de cámara de Neubauer de 9 mm <sup>2</sup> .	53
<b>Figura 16.</b> Biorreactor Spinner de 100 mL.	65

## LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
<b>Gráfica 1.</b> Curva patrón de Glucosa.	56
<b>Gráfica 2.</b> Concentración celular y desviación estándar en experimento 1 en microplaca de 24 pozos.	59
<b>Gráfica 3.</b> Concentración celular y desviación estándar en experimento 2 en microplaca de 24 pozos.	60
<b>Gráfica 4.</b> Concentración celular y viabilidad del experimento 1 en microplaca de 24 pozos.	61
<b>Gráfica 5.</b> Concentración celular y viabilidad del experimento 2 en microplaca de 24 pozos.	62
<b>Gráfica 6.</b> Concentración celular y viabilidad en el experimento 1 en caja de Petri.	63
<b>Gráfica 7.</b> Concentración celular y viabilidad en el experimento 2 en caja de Petri.	64
<b>Gráfica 8.</b> Concentración celular y viabilidad en el experimento 1 en el biorreactor spinner de 250 mL.	67
<b>Gráfica 9.</b> Concentración celular y viabilidad en el experimento 2 en el biorreactor spinner de 250 mL.	68
<b>Gráfica 10.</b> Concentración de glucosa en el experimento 1 del biorreactor spinner de 250 mL.	70
<b>Gráfica 11.</b> Concentración de glucosa en el experimento 1 del biorreactor spinner de 250 mL.	71
<b>Gráfica 12.</b> Ajuste usando la linealización de Langmuir.	76
<b>Gráfica 13.</b> Concentración de sustrato vs Concentración de células para el cálculo del coeficiente rendimiento sustrato/biomasa.	78
<b>Gráfica 14.</b> Comportamiento de las células en el biorreactor obtenida del modelo cinético propuesto comparado con los datos experimentales.	79
<b>Gráfica 15.</b> Comportamiento del sustrato en el biorreactor obtenida del modelo cinético propuesto, comparado con los datos experimentales.	79

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Cuadruplicado del experimento 1 en microplaca de 24 pozos.	57
<b>Tabla 2.</b> Cuadruplicado del experimento 2 en microplaca de 24 pozos.	58
<b>Tabla 3.</b> Promedio, desviación estándar y varianza del experimento 1 en microplaca de 24 pozos.	58
<b>Tabla 4.</b> Promedio, desviación estándar y varianza del experimento 1 en microplaca de 24 pozos.	59
<b>Tabla 5.</b> Experimento 1 en microplaca de 24 pozos.	60
<b>Tabla 6.</b> Experimento 2 en microplaca de 24 pozos.	61
<b>Tabla 7.</b> Experimento 1 en caja de Petri.	63
<b>Tabla 8.</b> Experimento 2 en caja de Petri.	64
<b>Tabla 9.</b> Experimento 1 en el biorreactor spinner de 250 mL.	67
<b>Tabla 10.</b> Experimento 2 en el biorreactor spinner de 250 mL.	68
<b>Tabla 11.</b> Producción de células REH en diferentes escalas.	69
<b>Tabla 12.</b> Absorbancia y concentración de azúcares en el experimento 1 en el biorreactor spinner de 250 mL.	70
<b>Tabla 13.</b> Absorbancia y concentración de azúcares en el experimento 2 en el biorreactor spinner de 250 mL.	71
<b>Tabla 14.</b> Evaluación de las velocidades de crecimiento de biomasa a partir de los datos de formación de biomasa y consumo de sustrato.	75
<b>Tabla 15.</b> Comparación de los datos experimentales y los datos obtenidos del modelo para el crecimiento celular.	80
<b>Tabla 16.</b> Comparación de los datos experimentales y los datos obtenidos del modelo para el consumo de sustrato.	81

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
<b>ANEXO A. Protocolo 1:</b> obtención de azul de tripano.	91
<b>ANEXO B. Protocolo 2:</b> conteo celular por medio de cámara de Neubauer.	92
<b>ANEXO C. Protocolo 3:</b> cambio de medio.	93
<b>ANEXO D. Protocolo 4:</b> determinación de azúcares reductores mediante Ácido Dinitrosalicílico (DNS).	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
g	Gramos
mL	Mililitros
L	Litros
$\mu$ L	Microlitros
s	Segundos
$^{\circ}$ C	Grados Celcius
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
O <sub>2</sub>	Oxígeno Diatómico
(%v/v)	Porcentaje volumen - volumen
SFB	Suero fetal Bovino
REH	Línea celular de leucemia linfocítica aguda de humano.
DNS	Acido 3,5 Dinitrosalicílico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
Min	Minutos
h	Horas
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima específica de crecimiento
Td	Tiempo de duplicación
X	Concentración células viables
V	Volumen

## GLOSARIO

**BIORREACTOR:** es un sistema que mantiene activamente un ambiente biológico, en donde se llevan a cabo procesos químicos, involucrando microorganismos y sustancias activas por medio de agitación mecánica que permite una mayor homogeneidad en la distribución de células y el medio de cultivo.

**CULTIVO CELULAR:** conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades genéticas, fisiológicas y bioquímicas.

**ESCALAMIENTO:** se define como el procedimiento para diseñar y construir un sistema de gran escala, en base a los resultados de la experimentación obtenidos en un sistema de pequeña escala.

**LÍNEA CELULAR:** la línea celular es un cultivo celular ya establecido de manera permanente que se proliferará ilimitadamente en condiciones apropiadas.

**MEDIO DE CULTIVO:** el medio de cultivo es un líquido o un gel diseñado para favorecer el crecimiento de microorganismos, células o pequeñas plantas. Un medio de cultivo típico está compuesto de un complemento de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa y suero como factores de crecimiento, hormonas y factores de adhesión.

**MEDIO RPMI 1640:** (Roswell Park Memorial Institute medium). Medio desarrollado para cultivos de células humanas de leucemia en suspensión y en monocapa.

**MÉTODO DNS:** (técnica de Miller) es una técnica colorimétrica que emplea ácido 3,5 dinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra.

**REH:** línea celular de leucemia linfocítica aguda de humano.

**SUERO FETAL BOVINO:** el suero fetal bovino es el suplemento más común en los medios de cultivo de células animales. Es utilizado como un complemento de bajo costo para proveer un medio de cultivo óptimo. Provee portadores de nutrientes lábiles o insolubles en agua, hormonas y factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, y neutraliza sustancias tóxicas.

**SUSPENSIONES CELULARES:** es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato porque son independientes del anclaje. Es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores. Cabe destacar que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en suspensión.

**VIRUS ONCOLÍTICO:** tipo de virus que infecta y lisa (descompone) las células cancerosas, pero no las células normales. Se pueden presentar de forma natural o se pueden producir en el laboratorio al alterar otros virus. Ciertos virus oncolíticos están en estudio para el tratamiento de cáncer. Estos facilitan la destrucción de las células tumorales cuando se administra quimioterapia y radioterapia.

## RESUMEN

El propósito de este proyecto es evaluar el escalamiento de la producción de células de leucemia linfocítica aguda de humano (REH), con el fin de obtener concentraciones máximas de éstas, ya que sirven como células huésped para la replicación del virus oncolítico WT1-5, causante de la gastroenteritis infantil.

El escalamiento se trabajó desde microplacas de 24 pozos, seguido por el experimento en cajas de Petri, en donde en ambas escalas se evaluó la cinética de crecimiento y la viabilidad celular, con el fin de obtener datos como la velocidad específica de crecimiento y el tiempo que demoran las células en duplicarse. Luego se hicieron los respectivos experimentos en el reactor spinner de 250 mL, en donde, además de evaluar la cinética de crecimiento y su viabilidad, se obtuvieron datos del consumo de glucosa en cada muestra que se utilizó para hacer el respectivo conteo celular, llegando a evidenciar una relación entre el consumo de glucosa y la concentración celular.

Posteriormente, se hace una simulación del reactor spinner de 250 mL, en el programa de código abierto MATLAB, en donde los resultados conseguidos se comparan con los datos obtenidos de manera experimental.

Al finalizar cada uno de los experimentos, las células que crecieron en caja de Petri y en el reactor spinner de 250 fueron entregadas para la posterior infección y producción del virus WT1-5 nombrado anteriormente.

**Palabras clave:** cultivo Celular, biorreactor spinner, escalamiento, línea celular, cinética de crecimiento.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, en el 2015 ocasionaron 8,8 millones de defunciones, una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad<sup>1</sup>. Dependiendo del tipo de cáncer se requiere un protocolo específico que puede abarcar una o más modalidades, tales como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia, las cuales tienen efectos limitados contra muchas formas de cáncer, además de los efectos secundarios que se podrían presentar durante y después de los tratamientos<sup>2</sup>. Por lo tanto, los esfuerzos de investigación en todo el mundo se centran en el desarrollo de nuevos tratamientos o terapias paliativas que pueden llegar a tener resultados positivos en donde el paciente presente una recuperación y asimile el tratamiento al cual está siendo expuesto.

En la actualidad se intentan desarrollar diferentes tratamientos que incluyen la viroterapia oncolítica, la cual se ha convertido en una alternativa para el tratamiento del cáncer que puede ser prometedora. Estos virus se caracterizan por ser partículas no patógenas que infectan específicamente células cancerosas provocando su muerte sin afectar los tejidos sanos<sup>3</sup>.

Por ello desde hace algunos años, el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (LMBV-UN, Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá, Colombia) ha venido desarrollado una extensa investigación sobre rotavirus y ha notado el potencial oncolítico de varias cepas de rotavirus de tipo silvestre, tanto murino como humano<sup>4</sup>. En la actualidad dicho proceso de obtención del rotavirus se realiza mediante la infección de diferentes cultivos de células.

Con base en lo anterior, se pretende realizar un escalamiento del proceso de producción de células huésped de la línea celular REH (leucemia linfocítica aguda de humano) cultivadas previamente en microplacas de 24 pozos. El escalamiento

---

<sup>1</sup> ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. [Sitio web]. OMS. [consulta: 26 julio 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

<sup>2</sup> WONG, Han Hsi; LEMOINE, Nicholas R. y WANG, Yaohe. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. En: Viruses. DOI 10.3390/v2010078. Vol.; 2 (2010); p. 79.

<sup>3</sup> MARTÍN BAUTISTA, Liliana. Análisis de la unión del rotavirus a los glóbulos rojos y el efecto que tiene dicha unión en la capacidad infecciosa en líneas tumorales. Tesis de magíster en ciencias, microbiología. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. 2015. V p.

<sup>4</sup> LOZANO ROMERO, E; GODOY SILVA, E. y GUERRERO, Carlos A. (52h) Scale-up of the Production of Rotavirus on Sp2/0-Ag14 Cell Culture up to 2L Bioreactor. [En línea]. En: AIChE Annual Meeting (Atlanta, Estados Unidos) Atlanta.2014. párr. 2. [Consultado: 19 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.iche.org/conferences/aiche-annual-meeting/2014/proceeding/paper/52h-scale-production-rotavirus-on-sp20-ag14-cell-culture-2l-bioreactor-1>

se trabajará desde cajas de Petri a un reactor spinner de 250 mL, después de haber hecho las respectivas evaluaciones de muestras obtenidas de las diferentes escalas, las células son entregadas para la infección y producción del virus WT1-5.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la producción de células de leucemia linfocítica aguda (REH) en un biorreactor spinner de 250 mililitros.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer la productividad de las células de leucemia linfocítica aguda (REH) en microplaca y caja de Petri.
- Determinar las condiciones de producción de células de leucemia linfocítica aguda (REH) en un biorreactor spinner de 250 mililitros.
- Comparar la cinética de crecimiento, productividad de las células de leucemia linfocítica aguda (REH) y el consumo de glucosa que se obtiene en biorreactores spinner de 250 mililitros.

## 1. GENERALIDADES

En este capítulo se describen los aspectos generales de los cultivos celulares, particularmente de los cultivos de células animales, donde se menciona la clasificación y los tipos de cultivos; así como también el tipo de biorreactor utilizado en el proceso de escalamiento. Luego se especifican las variables que deben ser monitoreadas durante el proceso de producción de células REH (Línea celular de leucemia linfocítica aguda), el método utilizado para la cuantificación de glucosa y conceptos básicos de escalamiento para un proceso biológico.

### 1.1 CÁNCER

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo<sup>5</sup>. Se origina por el crecimiento celular incontrolado en alguna parte del cuerpo. La transformación de las células normales en células cancerosas surge como consecuencia del daño del DNA, dando lugar a células incapaces de controlar su crecimiento y su división<sup>6</sup>, por lo que produce la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina metástasis, las cuales son la principal causa de muerte por cáncer<sup>7</sup>.

Las células cancerosas presentan características propias que las diferencian de las células normales, una de ellas es la capacidad para evadir el sistema inmune, tejidos, una red de órganos y células especializadas que nos protegen frente a organismos patógenos<sup>8</sup>. El sistema inmune es capaz de actuar frente a células dañadas o anormales, sin embargo, algunas células cancerosas se han desarrollado hasta tal punto de pasar desapercibidas<sup>9</sup>.

**1.1.1 Causas.** El cáncer se produce por la transformación de células normales en células tumorales en un proceso en varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno<sup>10</sup>. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres

---

<sup>5</sup> ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Op. cit. párr. 9.

<sup>6</sup> FUNDACIÓN PARA LA EXCELENCIA Y LA CALIDAD DE LA ONCOLOGÍA. [sitio web]. ECO, Generalidades en Oncología. [Consulta: 26 julio 2018]. Disponible en: <https://www.fundacioneco.es/wp-content/uploads/2014/04/1.Generalidades.pdf>

<sup>7</sup> ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Op. cit. párr. 9

<sup>8</sup> HERRRERO FERNANDEZ, Beatriz. VIRUS: ¿NUEVA HERRAMIENTA TERAPÉUTICA CONTRA EL CÁNCER? [sitio web]. [Consulta: 29 diciembre 2018]. Disponible en: <https://biotecnologia.fundaciontelefonica.com/2016/10/12/virus-nueva-herramienta-terapeutica-contr-el-cancer/>

<sup>9</sup> CANCERQUEST. [sitio web]. El Sistema Inmunológico. [Consulta: 29 noviembre 2018]. Disponible en: <https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/el-sistema-inmune>

<sup>10</sup> ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Op. Cit. Párr. 11.

categorías de agentes externos, los cuales, según la Organización Mundial de la Salud<sup>11</sup> son: los carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas y ionizantes, los carcinógenos químicos, como el amianto, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas que son los contaminantes de los alimentos y el arsénico que es principal contaminante del agua de bebida, por último, los carcinógenos biológicos, como determinados virus, bacterias y parásitos.

Otra de las causas fundamentales en la aparición del cáncer es el envejecimiento. Por la edad muy probablemente se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer, y esta acumulación general de factores de riesgo se combina con la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular que ocurren con la edad<sup>12</sup>.

**1.1.2 Tratamiento.** Aunque los tratamientos para la enfermedad han mejorado de manera significativa, la quimioterapia o radioterapia convencionales aún tienen efectos limitados contra muchas formas de cáncer, sin mencionar una gran cantidad de efectos secundarios relacionados con el tratamiento<sup>13</sup>.

Existen diferentes tipos de tratamientos para el cáncer, pero para lograr identificar el tratamiento adecuado es necesario conocer el tipo de cáncer y que tan avanzado se encuentra, así como los posibles efectos secundarios, las preferencias del paciente y el estado de salud en general.

Tanto la detección como el tratamiento del cáncer requieren una correcta coordinación de distintas especialidades que aporten una visión integral de la enfermedad para abordar con mayor garantía todos los aspectos del proceso oncológico<sup>14</sup>. Dentro de los diferentes tipos de tratamientos médicos se encuentran:

- Cirugía: la cirugía es un procedimiento en el que se extirpa el cáncer del cuerpo, o en la mayoría de los casos, reducir el volumen tumoral.
- Radioterapia: es un tratamiento que usa altas dosis de radiación (ionizante) para destruir células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores aliviando algunos síntomas.

---

<sup>11</sup> Ibid., párr. 11.

<sup>12</sup> Ibid., párr. 14.

<sup>13</sup> WONG, Han Hsi; LEMOINE, Nicholas R. y WANG, Yaohe. Op. Cit., p. 79.

<sup>14</sup> FUNDACIÓN PARA LA EXCELENCIA Y LA CALIDAD DE LA ONCOLOGÍA. [sitio web]. ECO, Generalidades en Oncología. [Consulta: 26 julio de 2018]. Disponible en: <https://www.fundacioneco.es/wp-content/uploads/2014/04/1.Generalidades.pdf>

- **Quimioterapia:** es un tipo de tratamiento del cáncer que usa fármacos para destruir y parar o retrasar el crecimiento de células cancerosas. La vía de administración puede variar en función del fármaco.

El reto de los científicos lleva siendo desde hace un tiempo, desarrollar una estrategia no tan dañina pero igual de eficaz; es en este punto donde han aparecido dos ideas principales: la estimulación del propio sistema inmune y el tratamiento con virus<sup>15</sup>. Es conocido, que, al contrario de los virus oncogénicos, los virus también pueden ser oncolíticos, los cuales infectan y aniquilan células de ciertos tumores.

## **1.2 VIRUS ONCOLÍTICO**

Los virus son organismos que necesitan de una célula viva para su reproducción. Lo que hacen los virus es invadir la célula y utilizar su maquinaria enzimática para mantenerse vivos y poderse replicar, tras provocar la lisis de la célula, diseminar las partículas víricas a otras células a las que infecta y de esta manera poder comenzar así un ciclo vírico.

Dada la explicación anterior los virus oncolíticos son virus que se encuentran en la naturaleza o que están modificados genéticamente, estos virus infectan y eliminan de forma preferencial las células tumorales sin afectar las células sanas y así mismo estimulan la respuesta inmune de los pacientes contra el tumor<sup>16</sup>. La inmunoterapia viral hace valer dichas características y las emplea como arma contra el cáncer.

Se conoce que algunos virus son oncogénicos, es decir, pueden producir algún tipo de cáncer. Además, se sabe que otros virus son oncolíticos, es decir, que infectan y aniquilan células tumorales. La idea de cualquier persona que trabaje en esta área se va a centrar en modificar estos virus para que de esta manera ataquen y destruyan solo a las células tumorales y se multipliquen en ellas y a su vez realimenten el tratamiento hasta acabar con el cáncer por completo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el virus además de destruir las células cancerosas específicamente tiene que intentar sobrevivir a los ataques que el sistema inmune ejerza contra él; pues cabe recordar que se trata de un patógeno externo.

---

<sup>15</sup> HERRRERO FERNANDEZ, Beatriz. VIRUS: ¿NUEVA HERRAMIENTA TERAPÉUTICA CONTRA EL CÁNCER? [sitio web]. [Consulta: 29 diciembre 2018]. Disponible en: <https://biotecnologia.fundaciontelefonica.com/2016/10/12/virus-nueva-herramienta-terapeutica-contr-el-cancer/>

<sup>16</sup> TOLOSA, Amparo. Un virus modificado, nueva arma contra el cáncer. En: GENÉTICA MÉDICA NEWS. Vol 2. No 25 (mayo 2015); p. 23.

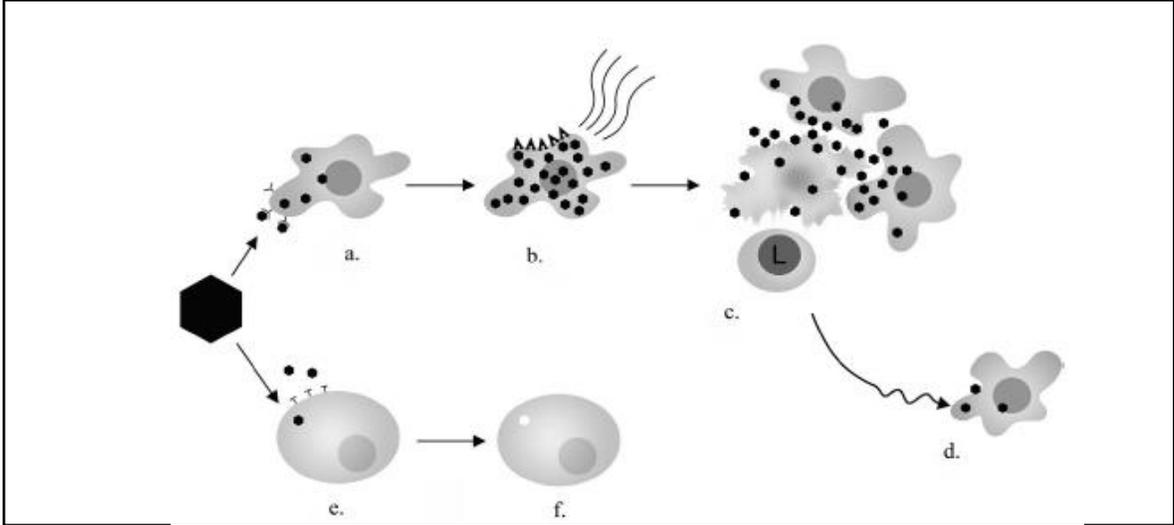
Varias características de los virus oncolíticos, en la que incluye la habilidad para replicarse, o multiplicarse en la célula huésped, son explicadas por Zse Daniel y compañía<sup>17</sup>. en la **figura 1**, en donde:

El virus oncolítico, representado por hexágonos negros, ataca una célula cancerosa (a). Como resultado del tropismo natural hacia un tipo de célula o un antígeno o receptor celular específico relacionado con el tumor, el virus ingresa a la célula maligna más fácilmente de lo que lo haría en una célula normal (e), la cual puede no exhibir la misma receptividad de una infección. Sobre la infectividad de las células malignas, la tolerancia natural de la célula que permite que el material genético maligno se propague también permite la replicación sin control del virus (b). Una infección de una célula normal (f) es evitada como resultado de la habilidad de la célula para reconocer y destruir el material genético anormal. La célula infectada producirá proteínas virales que son antígenos y que pueden alertar al sistema inmune y sí el virus está genéticamente armado, la célula puede producir citoquinas y otras señales químicas que activen el sistema inmune. Las células cancerígenas infectadas son lisadas por la infección viral, liberan nuevas partículas virales que infectarán las células malignas vecinas (c). La lisis libera nuevos virus y antígenos relacionados con el tumor, los cuales pueden ser reconocidos y atacados por el sistema inmune, representado aquí por un linfocito (L). La lisis relacionada con la viremia puede resultar en la infección de tejido metastásico (d), transformando un efecto local en un efecto sistémico.

---

<sup>17</sup> SZE, Daniel Y, REID, Tony R y ROSE, Steven C. Oncolytic Virotherapy. En: JOURNAL OF VASCULAR AND INTERVENTIONAL RADIOLOGY. [Sitio web]. [Consulta 12 junio 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1051044313010245?via%3Dihub>

**Figura 1.** Virus Oncolítico.



**FUENTE:** SZE, Daniel Y, REID, Tony R y ROSE, Steven C. Oncolytic Virotherapy. En: JOURNAL OF VASCULAR AND INTERVENTIONAL RADIOLOGY. [Sitio web]. [Consulta 12 junio 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1051044313010245?via%3Dihub>

Generalmente, los virus oncolíticos se dividen en dos clases<sup>18</sup>:

- Virus que se replican naturalmente preferentemente en las células cancerosas y no son patógenos en los seres humanos.
- Virus que son manipulados genéticamente para su uso como vectores de vacuna y/o aquellos diseñados genéticamente con mutaciones.

Lo que hacen los investigadores es tomar una serie de virus comunes para el ser humano como lo son adenovirus (típicos de la conjuntivitis y la gastroenteritis), herpesvirus (provocan herpes) o la influenza (virus de la gripe) y los modifican genéticamente<sup>19</sup>.

### 1.3 CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES

Se denomina cultivo celular a las células animales o de plantas que han sido removidas de sus tejidos, manteniéndose con nutrientes y en condiciones

<sup>18</sup> MARTÍN BAUTISTA. Op. cit., p.35.

<sup>19</sup> CAMPILLO, Santiago. Viroterapia, otra herramienta contra el cáncer. En: HELPING CÁNCER. [sitio web]. [Consulta 19 mayo 2018]. Disponible en: <https://www.helpingcancer.tv/viroterapia-otra-herramienta-contr-el-cancer/>

adecuadas en un laboratorio, esto se hace con el fin de favorecer su división, crecimiento, multiplicación y diferenciación en algunos casos<sup>20</sup>.

Durante los últimos años, el uso de cultivos de células animales dentro de la biotecnología farmacéutica se ha incrementado ya que han permitido estudiar la actividad intracelular, los flujos metabólicos, las interacciones con el medio ambiente, las interacciones célula-célula, la genética y la generación de metabolitos de interés, permitiendo la producción de biofármacos complejos<sup>21</sup>.

Actualmente se conoce como un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células “in vitro”, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas<sup>22</sup>.

Las células se cultivan y se mantienen a una temperatura apropiada y mezcla de gases habitualmente a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> en un incubador celular; las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo celular, y la variación de las condiciones para un tipo celular concreto, puede dar lugar a la expresión de diferentes fenotipos<sup>23</sup>.

Además de la temperatura y la mezcla de gases, el factor más común que se varía en los sistemas de cultivo es el medio de crecimiento, las recetas para los medios de crecimiento pueden variar en pH, concentración de glucosa, factores de crecimiento y la presencia de otros componentes nutritivos. Los factores de crecimiento usados para suplementar a los medios derivan a menudo de sangre animal, como el suero fetal bovino<sup>24</sup>.

---

<sup>20</sup> FRESHNEY, Robert Ian. Introduction. En: Culture of animals cells: A manual of basic technique. 4 ed. New York: John Wiley, 2005. p. 4.

<sup>21</sup> TAVIRA MONTALVAN, Carlos Alberto, et al. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. En: REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS. [sitio web]. México: [Consulta 5 noviembre 2017]. Archivo pdf. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912962006> Vol.; 40. No 4; p. 37.

<sup>22</sup> MARTINEZ SALAZAR, Verónica Sofía. Optimización del cultivo de células HEK293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus. [en línea]. Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas, 2007. [Consultado 13 enero 2019]. p. 5.

<sup>23</sup> ECURED. [sitio web]. Cultivo Celular. [Consulta: 6 agosto 2017, 10:25]. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Cultivo\\_Celular](https://www.ecured.cu/Cultivo_Celular)

<sup>24</sup> ECURED. [sitio web]. Cultivo Celular. [Consulta: 6 agosto 2017, 10:25]. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Cultivo\\_Celular](https://www.ecured.cu/Cultivo_Celular)

**Figura 2.** Cultivo de células animales distribuidas en cajas de Petri, frascos flask de 25 y 75 mL dentro de una incubadora.



**Fuente:** elaboración propia.

**1.3.1 Clasificación del cultivo celular.** Los cultivos celulares se definen como el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento, la supervivencia y la multiplicación in vitro de células que derivan de órganos específicos o de linajes celulares tratando de conservar al máximo sus propiedades bioquímicas, fisiológicas y genéticas<sup>25</sup>.

Por su discrepancia en su habilidad de adherencia a algún tipo de material específico, pueden formar monocapa o mantenerse en suspensión. Con mayor frecuencia los cultivos en suspensión ocurren con células “in vivo”<sup>26</sup>.

El cuidado y mantenimiento de las células que crecen en suspensión tiene una gran ventaja y es la facilidad a la hora de manipularlas ya que, durante el pase de un cultivo al siguiente, la separación del sustrato no requiere la adición de sustancias como la tripsina, aparte de esto es posible un mayor escalamiento debido a que dependen del medio y de la tensión de gases y no de la superficie del recipiente<sup>27</sup>.

<sup>25</sup> TAVIRA MONTALVAN, Carlos Alberto, et al. Op. Cit., p. 38

<sup>26</sup> COSSIO BAYÚGAR, Raquel, et al. Tipos de cultivo celular. En: Cultivo in vitro de células animales y sus aplicaciones. 3 ed. México: Grupo Garlong Impresores, SA. De C.V., 2011. p. 18.

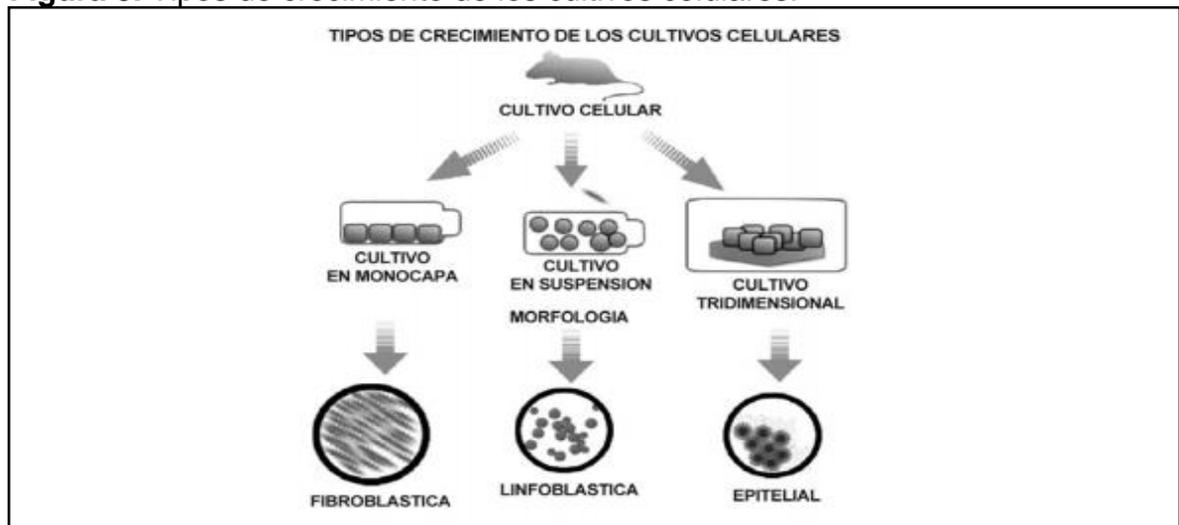
<sup>27</sup> Ibid., p.18.

**1.3.1.1 Cultivos en monocapa.** Estos cultivos representan una de las formas de crecimiento *in vitro* en células que son provenientes de líneas celulares o cultivos primarios dependientes de anclaje<sup>28</sup>. Las células que crecen de esta manera son estables genéticamente y aparte tienen una naturaleza diploide normal. El monocapa celular crece cubriendo la superficie de soporte hasta que establece contacto con otras células, lo que hace que se detenga su crecimiento<sup>29</sup>.

**1.3.1.2 Crecimiento en suspensión.** A partir de cultivos primarios se pueden generar líneas celulares que tienen como característica su gran capacidad para multiplicarse. Algunas líneas celulares pueden crecer en cultivos estacionarios o en suspensión tras un periodo de adaptación<sup>30</sup>. En este tipo de cultivo las células o agrupaciones celulares crecen y se multiplican suspendidas en un medio líquido que tiene los nutrientes necesarios para su proliferación.

**1.3.1.3 Cultivos tridimensionales.** Son cultivos que permiten mantener la estructura tal y como aparece en el tejido *in vitro*, permiten estudiar su mantenimiento, proliferación e interacciones con otras células que se encuentran alrededor, así como también el efecto de diferentes drogas o sustancias que sean citotóxicas<sup>31</sup>.

**Figura 3.** Tipos de crecimiento de los cultivos celulares.



**Fuente:** TAVIRA MONTALVAN, Carlos Alberto, et al. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. En: REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS. [sitio web]. México: [Consulta 5 noviembre 2017]. Archivo pdf. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912962006> Vol.; 40. No 4; p. 38

<sup>28</sup> TAVIRA MONTALVAN, Carlos Alberto, et al. Op. cit., p. 38.

<sup>29</sup> Ibid., p. 38.

<sup>30</sup> COSSIO BAYÚGAR, Raquel, et al. Op. cit., p. 19.

<sup>31</sup> Ibid., p. 20.

**1.3.1.4 Líneas Celulares.** Estas células se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron, proliferan de manera ilimitada. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario<sup>32</sup>.

**1.3.1.5 Cultivos primarios.** Los cultivos primarios provienen directamente de un tejido que conserva la morfología del órgano o tejido de donde se derivan manteniendo su número diploide. Su mayor parecido con las células de donde se originaron es su funcionalidad, poseen una baja probabilidad de que se transformen en malignos por lo tanto se pueden utilizar para la producción de vacunas<sup>33</sup>.

Por otro lado, el cultivo de células animales presenta tres morfologías diferentes según la **figura 3** las cuales son: Linfoblástica, fibroblástica y epitelial. Estas morfologías están relacionadas con el origen del tejido primario. Las líneas con morfología linfoblástica crecen en suspensión mientras que las dos últimas crecen en forma adherente<sup>34</sup>.

**1.3.2 Tipos de cultivos de tejidos.** Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración se habla de diferentes tipos de cultivos<sup>35</sup>:

---

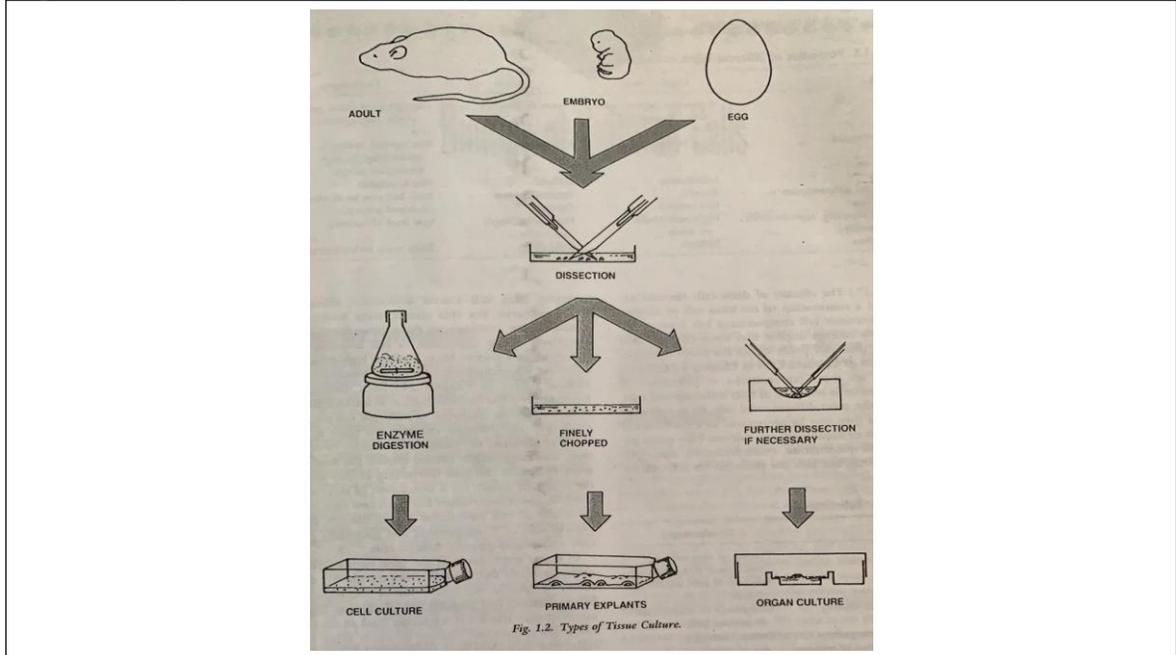
<sup>32</sup> Cultivos Celulares, Elemento Fundamental para la Investigación, Líneas Celulares. [sitio web] En: REVISTA ACOVEZ. vol. 24, no. 1. [Consulta: 23 agosto 2018]. Disponible en: [https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24\\_desarrollos16/](https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24_desarrollos16/)

<sup>33</sup> COSSIO BAYÚGAR, Raquel, et al. Op cit., p. 19.

<sup>34</sup> TAVIRA MONTALVAN, Carlos Alberto, et al. Op. cit., p. 38.

<sup>35</sup> MARTINEZ SALAZAR. Op. Cit., p. 5.

**Figura 4.** Tipos de cultivos de tejidos.



**Fuente:** FRESHNEY, Robert Ian. Introduction. En: Culture of animals cells: A manual of basic technique. 4 ed. New York: John Wiley, 2005. p. 7.

**1.3.2.1 Cultivo de Órganos.** En este tipo de cultivo al menos una parte de la arquitectura del tejido 'in vivo' se mantiene. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados, por lo tanto, es una buena réplica del tejido de origen, pero tiene problemas al no permitirse su propagación, pues su crecimiento se limita solo a la periferia. Esto obliga a partir de nuevo material animal en cada nuevo experimento, lo que conlleva a una elevada heterogeneidad<sup>36</sup>.

**1.3.2.2 Explantes primarios.** Un fragmento de tejido o de órgano se coloca en la interfase sólido-líquido de una superficie de vidrio o plástico, en donde las células se adhieren y las células de la periferia del explante pueden migrar y proliferar por la superficie<sup>37</sup>.

**1.3.2.3 Cultivo Celular.** Es el tipo de cultivo más utilizado e implica que el tejido o la extensión del explante primario se disgregue, ya sea por medios enzimáticos o mecánicos en una suspensión celular, la cual se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. En estos cultivos se pierden las interacciones celulares<sup>38</sup>.

<sup>36</sup> FRESHNEY. Op. cit., p. 6.

<sup>37</sup> Ibid., p. 6.

<sup>38</sup> Ibid., p. 6.

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular. Entre las áreas de investigación que fuertemente dependen de las técnicas de cultivo celular se encuentran: virología, inmunología, ecología celular, ingeniería de proteínas y aplicaciones diagnósticas<sup>39</sup>.

#### 1.4 CULTIVOS DE CÉLULAS EN UN BIORREACTOR

El cultivo de células tiene su origen en el siglo XIX, cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vasos de vidrio<sup>40</sup>.

Durante la segunda mitad del siglo XX hubo un gran esfuerzo por desarrollar medios y prácticas de cultivo para producir cultivos celulares viables y proliferativos a partir de una gran variedad de organismos. Se han obtenido líneas celulares específicas a partir de órganos humanos tales como el hígado, el riñón, pulmón, nódulos linfáticos, corazón y ovario, junto con un amplio rango de líneas de células cancerígenas<sup>41</sup>.

En un principio, el objetivo del estudio de las células, era observar y analizar cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuándo dejan de crecer. Este tipo de estudios todavía hoy en día tienen un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de las células tumorales y la modulación de la expresión genética<sup>42</sup>.

Las células eucariotas, se han cultivado y se siguen cultivando en general, dentro de recipientes de vidrio o plástico, como cajas de Petri o frascos de Roux, en medios de cultivo que contienen una serie de moléculas como sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas como nutrientes, a 37°C y en condiciones apropiadas de humedad y oxigenación, así como de esterilidad<sup>43</sup>.

---

<sup>39</sup> MARTINEZ SALAZAR. Op. Cit., p. 6.

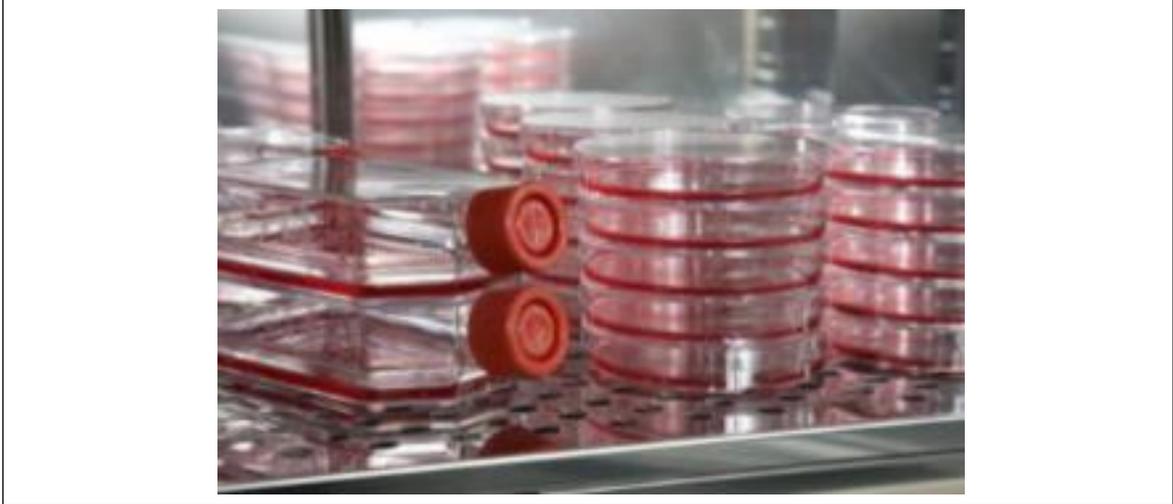
<sup>40</sup> SPECTOR, Myron. Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. En: SWISS MEDICAL WEEKLY. [sitio web]. [Consulta 16 junio 2017]. Archivo pdf. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/e81a/ce3040354cc46df05bbaeb7b6108c02ee55e.pdf> . vol. 136, p. 293.

<sup>41</sup> RAMIREZ REIVICH, Octavio T. Ingeniería Bioquímica. En: BOLIVAR ZAPATA, FRANCISCO G., ed. *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. 2 ed. México: 2007. pp. 249-296. ISBN 978-970-640-352-0.

<sup>42</sup> FRAHM, Björn, et al. Determination of dissolved CO<sub>2</sub> concentration and CO<sub>2</sub> production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement. En: JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. [sitio web]. Vol. 99, nro. 2, pp. 133-148. Archivo pdf. [Consultado 12 junio 2018]. DOI: //doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00180-3

<sup>43</sup> MARTIN, Ivan; WENDT, David y HEBERER, Michael. The role of bioreactors in tissue engineering. En: TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. [sitio web]. Vol. 22, nro. 2, pp. 80-86. Archivo pdf. [Consultado 12 junio 2018]. DOI: //doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001

**Figura 5.** Cultivo de células distribuidas en cajas de Petri y en frascos flask dentro de una incubadora.



**Fuente:** CÁRDENAS BELTRÁN, Nathaly. Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas). [en línea]. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, 2013. [Consultado 10 septiembre 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11818/CardenasBeltranNathaly2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

El cultivo de células en biorreactores ha generado ciertas dinámicas favorables para las células, lo que ha permitido que estas se encuentren en sus condiciones normales de crecimiento, y así el cultivo se vea beneficiado<sup>44</sup>.

El biorreactor, es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial. Es el recipiente donde se realiza el cultivo, y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos<sup>45</sup>.

Según Ertola<sup>46</sup> las "tareas" que realiza el biorreactor pueden resumirse del siguiente modo:

- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
- Mantener constante y homogénea la temperatura.
- Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.

<sup>44</sup> RAMIREZ REIVICH. Op. cit., p. 270.

<sup>45</sup> ERTOLA, Rodolfo; YANTORNO, Osvaldo y MIGNONE, Carlos. Sistemas de cultivo y aspectos generales de biorreactores. En: Microbiología Industrial. Washington, D.C.: 1994. p. 75. ISBN 9879508106

<sup>46</sup> Ibid., p. 70.

- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro.

Para satisfacer los cuatro primeros puntos es necesario que el biorreactor esté provisto de un sistema de agitación, además, para el cuarto punto se requiere de un sistema que inyecte aire en el cultivo.

Comercialmente los biorreactores que se utilizan para cultivar células superiores son modificaciones de reactores utilizados para la fermentación de células procariotas (bacterias). Sin embargo, las células eucariotas superiores son más frágiles a los esfuerzos cortantes que las procariotas ya que están rodeadas por una membrana frágil que puede dañarse por colisiones con las paredes del biorreactor o por los esfuerzos cortantes que se generan en el fluido. Además, el tipo de células eucariota requieren una superficie sólida en donde se puedan reproducir, y finalmente se requiere abastecer continuamente de oxígeno y nutrientes a las células, además de eliminar los desechos para satisfacer los requerimientos bioquímicos de estas células, razón por la cual se han diseñado nuevos biorreactores con la finalidad de proporcionar un ambiente adecuado para el cultivo de estas células<sup>47</sup>.

**1.4.1 Biorreactor spinner.** Uno de los reactores utilizados en el cultivo de células eucariotas es el biorreactor spinner que se muestra en la **figura 6**. En este biorreactor el medio es movilizado por un agitador magnético localizado en el piso. En ellos los coeficientes de transporte de masa son bajos cuando la agitación es lenta y los esfuerzos de corte pueden dañar los tejidos cuando se manejan velocidades de agitación muy altas<sup>48</sup>.

Los biorreactores spinner utilizados en ingeniería de tejidos, manejan volúmenes pequeños menores a 400 mL o en algunos casos pueden ser más grandes, esto permite que puedan colocarse dentro de incubadoras que garantizan el suministro de gases y mantienen la temperatura y las condiciones adecuadas para su crecimiento<sup>49</sup>.

---

<sup>47</sup> MORGAN, Sara J.; DARLING, David C. Cultivo de células animales. Traducido por Jesús García Sánchez. Zaragoza: Acribia, D.L.,1995. 159 p. ISBN 978-842-0007-77-9

<sup>48</sup> CASADIEGOS RINCON, Sergio Alexander. Evaluación de la transferencia de CO<sub>2</sub> al medio de cultivo en un biorreactor tipo spinner para el cultivo de fibroplastos. [en línea]. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia,2011. [Consultado 20 febrero 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/4018/1/192523.2011.pdf>

<sup>49</sup> Ibid., p. 13.

**Figura 6.** Biorreactores spinner (Corning) de 250 y 1000 mL.



**Fuente:** CORNING. [sitio web]. 250 mL Corning ProCulture Glass Spinner Flask with 70 mm Flat Center Cap and 2 Angled Sidearms. [Consulta: 20 enero 2019]. Disponible en: <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2b/MX/en/Cell-Culture/Cell-Culture-Vessels/Flasks,-Culture/Corning®-ProCulture-Glass-Spinner-Flask-with-Angled-Sidearms/p/4500-250>

**1.4.2 Variables que deben ser monitoreadas durante el proceso del cultivo de las células eucariotas en biorreactores.** Dentro del cultivo de las células eucariotas superiores, se deben monitorear ciertos factores. Estos factores se dividen en físicos, donde se encuentra el tipo de biorreactor, la temperatura y la agitación; en los factores fisicoquímicos, está el pH, el oxígeno disuelto y el dióxido de carbono disuelto, y en los factores biológicos se encuentran tipo de célula a cultivar y la densidad celular<sup>50</sup>.

**1.4.2.1 Temperatura.** La temperatura, que es un factor físico muy importante, en la mayoría de los cultivos de células eucariotas debe estar entre 25°C y 37°C para que las células puedan crecer satisfactoriamente; sin embargo, la temperatura óptima, dada las circunstancias de su crecimiento natural es de 37°C<sup>51</sup>.

---

<sup>50</sup> CÁRDENAS BELTRÁN, Nathaly. Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas). [en línea]. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, 2013. [Consultado 10 septiembre 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11818/CardenasBeltranNathaly2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>51</sup> Ibid., p. 15.

Influye en el pH del medio, por lo que se recomienda ajustar el pH del medio 0,2 unidades por debajo del pH óptimo, a temperatura ambiente, o preparar el medio, ajustar la temperatura y luego si el pH, antes de realizar el cultivo de las células<sup>52</sup>.

**1.4.2.2 pH.** El pH, la concentración de O<sub>2</sub> y de CO<sub>2</sub> que son parámetros fisicoquímicos, son factores determinantes en el crecimiento y el metabolismo celular. Variaciones pequeñas de pH afectan el crecimiento de las células, haciendo necesario el uso de reguladores que mantengan el pH en el rango óptimo para cada tipo de célula<sup>53</sup>.

El pH alto inhibe el metabolismo celular y la síntesis de proteínas, lo cual afecta el crecimiento celular. También, cuando la acción reguladora del tampón es afectada por la concentración de sus componentes o por los residuos del metabolismo de las células, el pH del medio disminuye produciendo estrés y afectando el funcionamiento celular<sup>54 55</sup>.

**1.4.2.3 Oxígeno.** El Oxígeno (O<sub>2</sub>) es uno de los sustratos indispensables en el metabolismo aerobio de las células. “*In vitro*” en el medio influye directamente en el crecimiento y en la expresión génica de las células. Por esto, uno de los fenómenos más importantes en el cultivo de células en biorreactores es la transferencia de masa de gases, dióxido de carbono y O<sub>2</sub>, al medio de cultivo<sup>56</sup>.

Para lograr una adecuada transferencia de masa entre la fase gaseosa y el medio líquido, es necesario implementar un sistema de aireación eficiente. Los sistemas de microdispersión de gas (burbujeo) son muy utilizados ya que proporcionan una alta transferencia de masa y son fáciles de operar<sup>57</sup>. Aunque el burbujeo del gas puede causar daño en las células cultivadas<sup>58</sup>, varias estrategias han sido

---

<sup>52</sup> PÖRTNER, Ralf, et al. Bioreactor design for tissue engineering. En: JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING. [sitio web]. Vol. 100, nro. 3, pp. 235-245. Archivo pdf. [Consultado 12 junio 2018]. DOI: //doi.org/10.1263/jbb.100.235

<sup>53</sup> CASADIEGOS RINCON. Op. cit., p. 15.

<sup>54</sup> MACKENZIE, Cosmo G.; MACKENZIE, Julia B. Y BECK, Paul. The effect of pH on growth, protein synthesis, and lipid-rich particles of cultured mammalian cells. En: THE JOURNAL OF BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL CYTOLOGY. [sitio web]. Vol. 9, pp. 141-156. Archivo pdf. [Consultado 12 junio 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13764902>

<sup>55</sup> MILLER, William M., et al. *Environmental effects on cell physiology and metabolism: Response to elevated pCO<sub>2</sub>*. En: Lindner-Olsson E., Chatzissavidou N., Lüllau E., eds. ANIMAL CELL TECHNOLOGY. 2001 pp. 121-128. ISBN 978-94-010-3897-3.

<sup>56</sup> CASADIEGOS RINCON. Op. cit., p. 15.

<sup>57</sup> *Ibid.*, p. 16.

<sup>58</sup> WU, Jianyong y GOOSEN, Mattheus F.A. Evaluation of the killing volume of gasbubbles in sparged animal cell culture bioreactors. En: ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY. [sitio web]. Diciembre 1995, vol. 17, nro.12. pp. 1036-1042. Archivo pdf. [Consultado 12

estudiadas para proteger a las células. Entre estas se encuentran el uso de aditivos, soportes o geles que protegen a las células manteniéndolas en su interior y el uso de una velocidad de aireación baja<sup>59</sup>.

**1.4.2.4 Agitación.** La agitación, se encarga de generar estímulos físicos que permitan el acceso a reguladores y nutrientes (glucosa, aminoácidos y oxígeno, entre otros) hacia las células. La agitación afecta la homogeneidad del acceso a nutrientes, como también la eliminación de los residuos metabólicos celulares y determina la calidad y uniformidad de los productos obtenidos e interviene directamente en la transferencia de masa entre la fase gaseosa y la fase líquida<sup>60</sup>.

La caracterización de la agitación en un biorreactor se calcula midiendo el tiempo de mezclado, el cual es el tiempo requerido por un biorreactor para alcanzar cierto grado de homogeneidad. Se puede medir con una reacción de neutralización ácido-base llevada a cabo dentro del biorreactor. La finalidad de la agitación en un biorreactor es dispersar el aire suministrado, obtener una temperatura y una concentración de nutrientes en todo el recipiente<sup>61</sup>.

**1.4.2.5 Medio de cultivo.** Se debe tener en cuenta el sustrato o medio de cultivo donde van a crecer las células, estos contienen una mezcla compleja de componentes orgánicos, tales como aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos y otros, junto con sales inorgánicas tamponantes. Algunos medios todavía contienen suero sanguíneo o suero bovino (5-20%) para el aporte de factores de crecimiento, elementos traza, lípidos y otros factores desconocidos. Sin embargo, el uso de suero genera muchos problemas, incluyendo la variabilidad del contenido de nutrientes entre lotes, la irregularidad de los suplementos, y más recientemente el miedo a que el suero pueda estar contaminado con partículas virales o priones<sup>62</sup>.

---

junio 2018]. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022994000026>

<sup>59</sup> CASADIEGOS RINCON. Op. cit., p. 16.

<sup>60</sup> CASADIEGOS RINCON. Op. cit., p.17.

<sup>61</sup> GIÁCOMAN VALLEJOS, German, et al. Análisis de la hidrodinámica de un reactor de flijo piston. *Revista Académica, Universidad Autónoma de Yucatán*. 2003, Vol. 7, nro. 003, pp. 7-19. ISSN 1665-529X

<sup>62</sup> CÁRDENAS BELTRÁN. Op. cit., p. 16.

**1.4.3 Ventajas y desventajas del cultivo celular en biorreactores.** Dentro de las ventajas del cultivo celular en biorreactores, se puede destacar el constante control que se tiene del medio, del pH, de la temperatura, de la presión osmótica, de la tensión de oxígeno (O<sub>2</sub>) y gas carbónico (CO<sub>2</sub>) de las células cultivadas y las condiciones fisiológicas que deben ser constantes. Los cultivos de células permiten someter a las mismas a una baja y definida concentración de reactivos asegurando un acceso directo en ellas<sup>63</sup>.

Las desventajas del cultivo celular son, que requiere unas condiciones de asepsia estrictas porque las células eucariotas se multiplican a una velocidad específica de crecimiento más baja que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los mohos y las levaduras. Además, muchas de las células requieren para su desarrollo además del medio de cultivo, suplementos como suero, plasmas y fluidos tisulares, entre otros para generar de alguna manera las condiciones semejantes a las “*in Vivo*” y pueda que estos productos sean costosos<sup>64</sup>.

Por otro lado, es necesario conocer el modelo de análisis de la cinética de crecimiento de este tipo de células eucariotas, está dado por la proliferación celular, el sustrato y la dinámica del biorreactor. La inhibición del crecimiento celular puede ser por diversos factores, como el sustrato, los antibióticos, la acumulación de productos entre otros<sup>65</sup>.

## **1.5 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR ESPECTROFOTOMETRÍA (Método DNS)**

El método (DNS) es una técnica colorimétrica que emplea ácido 3,5 dinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra, esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante una fermentación determinando las absorbancias por medio de un espectrofotómetro a 540 nm.<sup>66</sup>

---

<sup>63</sup> PATHI, Pragyansri; MA, Teng y LOCKE, Bruce R. Role of nutrient supply on cell growth in bioreactor design for tissue engineering of hematopoietic cells. En: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. [sitio web]. Marzo 2005, vol. 89, nro. 7, pp. 743-758. Archivo pdf. [Consultado 23 junio 2018]. DOI 10.1002/bit.20367

<sup>64</sup> LEVENSPIEL, Octave. Ingeniería de las reacciones químicas. 2 ed. México D.F.: Ediciones Repla, S.A., 1987. 276 p. ISBN 968-6165-03-7

<sup>65</sup> PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. En: TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. [sitio web], Vol. 9, nro. 1, pp. 427-437. Archivo pdf. [Consultado: 25 agosto 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0167779991901458>

<sup>66</sup> SLIDESHARE. [sitio web]. Determinación de azúcares reductores por espectrofotometría (Método DNS). [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/vegabner/determinacin-de-azcares-reductores-por-espectrofotometra-mtodo-dns>

El DNS reacciona exclusivamente con los azúcares reductores. La sacarosa es un disacárido no reductor, pero tras su hidrólisis en medio ácido se libera glucosa y fructosa que sí son reductores y de esta manera reaccionan con el DNS generando un producto coloreado. La intensidad del color, que se puede medir por métodos espectrofotométricos es proporcional a la concentración de sacarosa<sup>67</sup>.

Esta técnica es aplicable a todos los procedimientos de sistemas de cultivos de medios líquidos y sólidos cuya molécula de sustrato sean azúcares reductores como glucosa, xilosa, entre otros<sup>68</sup>.

**1.5.1 Glucosa.** La glucosa es un carbohidrato simple, es una de las principales moléculas que sirven como fuentes de energía para las plantas y los animales, estructuralmente es un azúcar de seis carbonos que posee un aldehído en un extremo de su forma lineal.

Todos los alimentos que consumimos eventualmente se convierten o son sintetizados en glucosa a través de una serie de reacciones metabólicas la cual es usada o almacenada como energía<sup>69</sup>.

**1.5.2 Azúcares reductores.** Los azúcares reductores son biomoléculas que funcionan como agentes reductores, es decir, que pueden donar electrones a otra molécula con la que reaccionan<sup>70</sup>. Es un carbohidrato que contiene un grupo carbonilo es su estructura (C=O).

## 1.6 ESCALAMIENTO

El concepto de escalamiento se define como un proceso en el cual se desarrollan los criterios y las reglas de asignación numérica que determinan las unidades de medida significativas para llevar un tamaño dado a otro tamaño, ya sea mayor o menor, una operación u objeto para cumplir una necesidad específica<sup>71</sup>.

---

<sup>67</sup> Ibid., p. 3.

<sup>68</sup> SCRIBD. [sitio web]. Metodo DNS. [ Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/349092123/Metodo-DNS>

<sup>69</sup> SCRIBD. [sitio web]. Determinacion de Azucars Reductores Por El Metodo Del DNS. [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/338160367/Determinacion-de-Azucars-Reductores-Por-El-Metodo-Del-DNS>

<sup>70</sup> LIFEDER.COM. [sitio web]. Azúcares reductores: Métodos para determinación, Importancia. [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/azucars-reductores/>

<sup>71</sup> ANAYA DURAND, Alejandro y PEDROZA FLORES, Humberto. Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. En: TECNOLOGÍA, CIENCIA, EDUCACIÓN. [sitio web]. México D.F. [Consulta 2 septiembre 2017]. Archivo pdf. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48223105>. vol. 23, pp. 31-39.

Un escalamiento de operaciones o equipos es una tarea ampliamente significativa a la hora del diseño, construcción y la operación normal de una planta de producción. Bisio y Kabel<sup>72</sup> definen el escalado como “operación y puesta en marcha de manera exitosa de una unidad de tamaño comercial cuyo diseño y procedimientos de operación se basan, en parte, en experimentación y demostración a una escala más pequeña de operación”.

De manera general, se puede entender el escalado como llevar a escala industrial una operación para la producción en masa de un producto, cuyo diseño y condiciones de operación, se basan en los resultados de investigación y experimentación obtenidos en una menor escala de laboratorio o una planta piloto<sup>73</sup>.

Usualmente, las condiciones no pueden ni siquiera aproximarse cuando se realiza el proceso para producción industrial, lo que presenta una dificultad en el escalado, pues depende de la combinación de una serie de factores los cuales hacen que aumente la complejidad del proceso que se va a llevar a cabo. Los fenómenos más relevantes en el escalado de bioprocesos son: la velocidad de agitación, la velocidad de aireación y las relaciones geométricas<sup>74</sup>. Esto se debe a que por las condiciones hidrodinámicas que se pueden presentar, los microorganismos pueden experimentar cambios en su metabolismo.

Tiene diversas aplicaciones industriales o de investigación. Se pueden lograr grandes beneficios a partir de la simulación a pequeña escala de nuevas condiciones que se vayan a implementar a nivel industrial, como el cambio de valores en parámetros del proceso, el uso de nuevos equipos, e incluso, la viabilidad de una nueva sección de operación o de una planta de producción en su totalidad<sup>75</sup>

Un propósito más amplio del escalamiento es la selección de las condiciones de diseño y de procedimientos operacionales para asegurar que el efecto de las diferentes variables del proceso sea el mismo en unidades de diferente tamaño. Por ejemplo, propiedades como la hidrodinámica y transferencias de masa se utilizan habitualmente como criterios para el escalamiento de biorreactores; igualmente, algunas de las principales variables se mantienen constantes, como la potencia de

---

<sup>72</sup> BISIO, Attilio y KABEL, Robert L. Scale-up of Chemical Processes, Citado por RUIZ COLORADO, Angela Adriana. Factores para la producción biotecnológica de etanol carburante. [en línea]. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, 2009. [Consultado 5 noviembre 2018]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/10291/1/43674021.2009.pdf>

<sup>73</sup> ANAYA DURAND, Alejandro y PEDROZA FLORES, Humberto. Op. cit., p. 31.

<sup>74</sup> RUIZ COLORADO, Angela Adriana. Factores para la producción biotecnológica de etanol carburante. [en línea]. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, 2009. [Consultado 5 noviembre 2018]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/10291/1/43674021.2009.pdf>

<sup>75</sup> ANAYA DURAND, Alejandro y PEDROZA FLORES, Humberto. Op. cit., p. 33.

agitación por volumen de reactor, el coeficiente de transferencia de masa volumétrica, o el tiempo de mezclado<sup>76</sup>.

**1.6.1 Factor de escala.** El factor de escala es una medida intuitiva del tamaño del sistema o bioproceso; básicamente se definen en: pequeña escala, mediana escala y gran escala. La escala es relativa al bioproceso que se realice, es decir, no es lo mismo realizar un bioproceso de cultivo in Vitro de tejidos animal o vegetal, que una fermentación alcohólica o un proceso de biorremediación in situ. No se puede decir que sean de pequeña, mediana y gran escala; sino que, cada uno de ellos, se puede situar en cualquiera de las escalas, dependiendo del volumen relativo del bioproceso<sup>77</sup>.

Tomando como ejemplo el cultivo in Vitro de una línea celular: pequeña escala es la placa de Petri o el tubo de ensayo; mediana escala es el balón de cultivo o el horno cultivador; y gran escala es el biorreactor o un cuarto de cultivo especialmente acondicionado para ese propósito<sup>78</sup>.

**1.6.2 Parámetros de escalamiento.** Existen varios factores influyentes en el escalado de un bioproceso, la primera aproximación es definir los parámetros de escalamiento más utilizados y seleccionar el más importante como criterio de escalamiento. Tal como lo expresa Ruíz<sup>79</sup> los fenómenos más relevantes en el escalado de bioprocesos son: la velocidad de agitación, la velocidad de aireación y las relaciones geométricas. Esto se debe a que las células pueden experimentar cambios en su metabolismo por las condiciones hidrodinámica.

Algunos autores expresan que el mejor criterio de escalamiento es el coeficiente de transferencia de oxígeno. Los métodos para estimar este coeficiente pueden ser químicos o físicos, siendo estos últimos más aceptados por los bajos errores que genera al escalamiento. Para este método físico, se requieren sensores de oxígeno con el fin de realizar monitoreo del cambio de concentración disuelta de oxígeno con respecto al tiempo durante la absorción y desorción del oxígeno en la solución<sup>80,81</sup>.

---

<sup>76</sup> NAJAFPOUR, Ghasem D. Bioprocess Scale Up. En: Biochemical Engineering and Biotechnology. 2 ed. 2015. p. 375-416.

<sup>77</sup> ACUÑA, R. Adimensionamiento y escalamiento de bioprocesos. [sitio web]. [consultado el 5 noviembre 2018, 12:28]. Disponible en: <https://bioreactorcrc.wordpress.com/2008/08/14/adimensionamiento-y-escalamiento-de-bioprosesos/>

<sup>78</sup> Ibid., párr. 2.

<sup>79</sup> RUIZ COLORADO. Op. cit., p. 21.

<sup>80</sup> Ibid., p. 21.

<sup>81</sup> DURANGO LONDOÑO, Laura Patricia. Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *Saccharomyces spp.* A nivel laboratorio. [en línea]. Tesis de pregrado. Universidad EAFIT, 2007. p.48. Disponible en:

Además, se tienen en cuenta distintos fenómenos como lo son: la transferencia de oxígeno al medio (Capacidad de recuperación de oxígeno bajo un tiempo determinado), tasa de respiración (respiración de toda la población bacteriana presente en el medio) y concentración crítica (Concentración de oxígeno disuelto mínimo antes de que se produzca hipoxia)<sup>82</sup>.

---

[https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/399/LauraPatricia\\_DurangoLondo%F1o\\_2007.pdf?sequence=1](https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/399/LauraPatricia_DurangoLondo%F1o_2007.pdf?sequence=1)

<sup>82</sup> DORAN, Pauline. Bioprocess engineering principles. 2 ed. Oxford: Academic Press, 2012. 417 p. ISBN 978-0-12-220851-5

## 2. METODOLOGIA

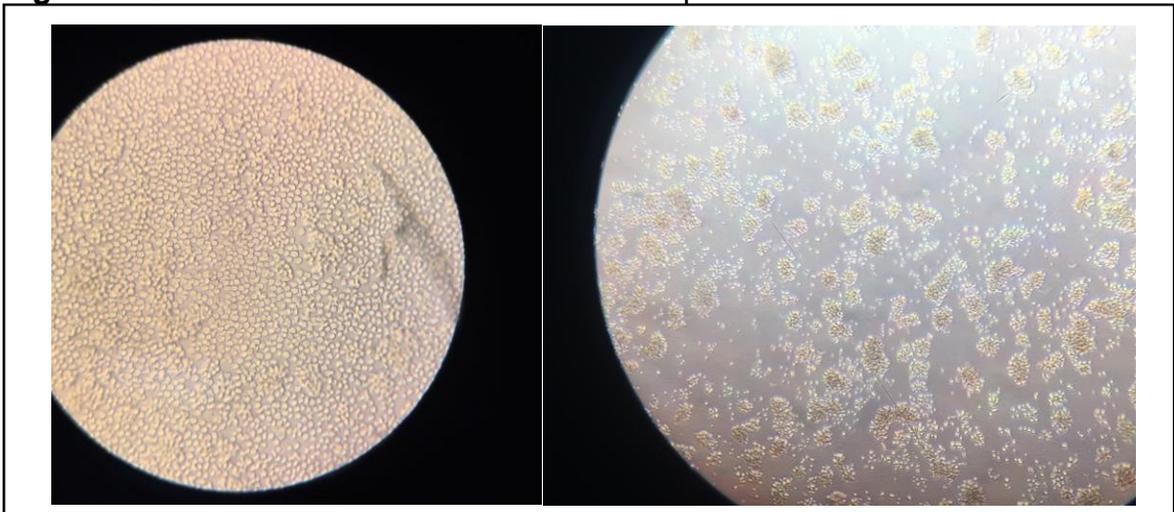
El capítulo de metodología se divide en dos secciones. La primera, los materiales y métodos, las características físicas del biorreactor utilizado y los procesos llevados a cabo en la que se especifican las condiciones de experimentación en cada escala del proceso empezando por el cultivo en microplacas de 24 pozos, las cajas de Petri y el biorreactor spinner de 250 mL en su respectivo orden. En la segunda parte se muestran los métodos utilizados para el recuento celular, la cuantificación celular y la cuantificación de glucosa.

### 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1.1 Materiales y reactivos

**2.1.1.1 Células REH.** Se trabajo con la línea celular REH que se pueden observar en la **figura 7** que proviene de células obtenidas de leucemia linfocítica aguda, con morfología linfoblástica, esta línea celular tiene un nivel de bioseguridad 1 y crece en suspensión<sup>83</sup>. La línea celular REH se cultiva en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB) e incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El cultivo y los doblajes poblacionales se realizaron en cabina de flujo laminar bajo estrictas condiciones de esterilidad cambiando el medio de cultivo cada tres días aproximadamente.

**Figura 7.** Células REH vistas desde el microscopio.



**Fuente:** elaboración propia.

<sup>83</sup> CASTAÑO TORO, Catalina. Identificación de marcadores de muerte celular que produce rotavirus WTEW en líneas tumorales REH y U937. [en línea]. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, 2014. [Consultado 15 enero 2018]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/46516/1/05599246.2014.pdf>

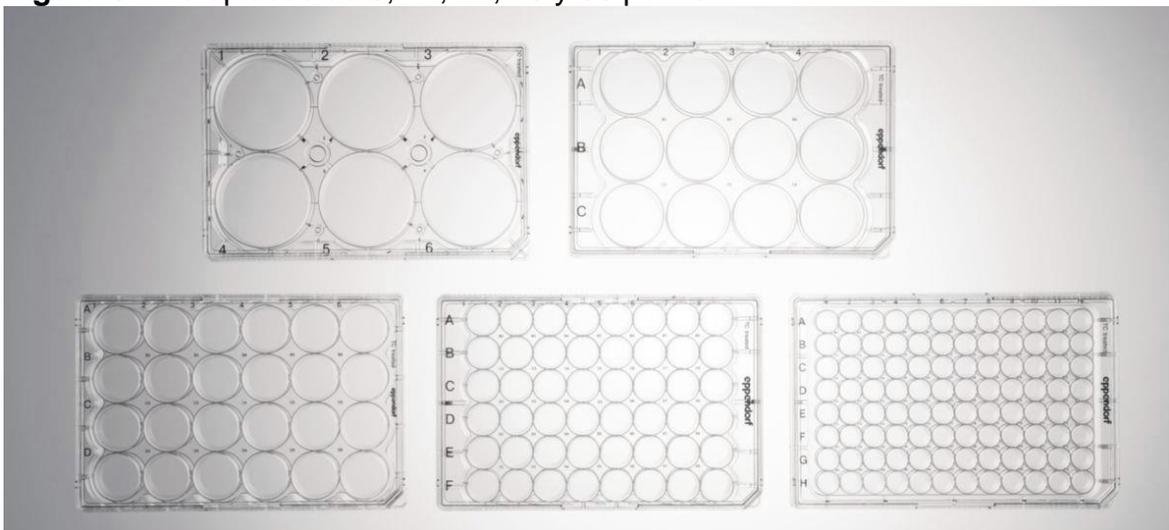
**2.1.1.2 Medio RPMI 1640.** Este medio fue originalmente desarrollado para cultivos de células humanas de leucemia en suspensión y en monocapa. Se diferencia de otros porque contiene un agente reductor llamado glutatión y vitaminas en altas concentraciones tales como Biotina, Vitamina B<sub>12</sub> y PABA (Ácido paraaminobanzoico ó vitamina B<sub>12</sub>), los cuales no se encuentran en otros medios como el EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) o el DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)<sup>84</sup>. Adicionalmente las vitaminas inositol y colina están presentes en altas concentraciones.

Este medio no contiene proteínas, lípidos o factores de crecimiento. Es por esto que se necesita una suplementación, comúnmente con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS). Cuenta con rojo de fenol como indicador de pH.

## 2.1.2 Equipos

**2.1.2.1 Microplacas.** Las microplacas, cajas de microtécnica o placas de microtitulación, tal como se muestra en la **figura 8**, son placas con múltiples pozos que se utilizan como pequeños tubos de ensayo. Los diferentes tipos de microplaca se han convertido en una herramienta muy útil en investigaciones de microbiología y biotecnología.

**Figura 8.** Microplacas de 6, 12, 24, 48 y 96 pozos.



**Fuente:** DIRECT INDUSTRY. [sitio web]. Microplaca de 96 pozos / de 24 pozos / de 48 pozos / de 12 pozos. [Consulta: 3 octubre 2018]. Disponible en: <http://www.directindustry.es/prod/ependorf/product-22548-1606915.html>

<sup>84</sup> THERMO FISHER SCIENTIFIC. [sitio web]. RPMI 1640 Medium. [Consulta: 24 septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11875093>

Existen diferentes tipos de microplacas que se diferencian por el número de pozos que tienen dentro de una matriz 3:2. En la **figura 8** se pueden observar las microplacas de 6, 12, 24, 36, 48 y 96 pozos.

**2.1.2.2 Biorreactor Spinner de 250 mL.** Este biorreactor (Corning) como se observa en la **figura 9** tiene una capacidad máxima de 250 mL, el cuello central es de 10 mm de diámetro y los brazos laterales un diámetro de 32 mm, con un ángulo de 45°, este diseño permite trabajar con pipetas de 10 y 25 mL. El equipo consta de deflectores laterales que mejoran la aireación y agitación del contenido.

El recipiente es de vidrio de borosilicato y otras partes están hechas de materiales que pueden ser limpiados y esterilizados las veces que sean necesarias para minimizar el riesgo de citotoxicidad.

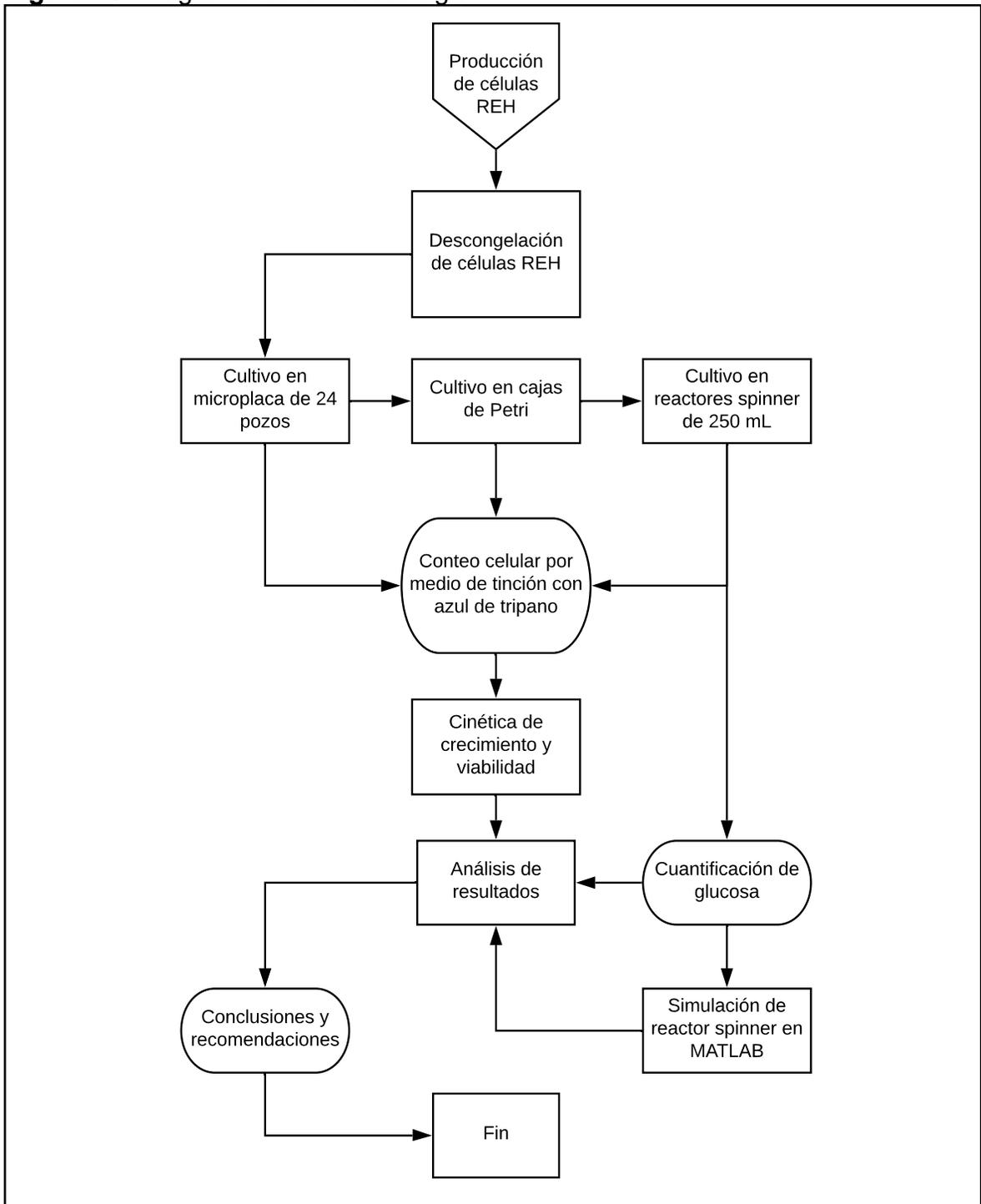
**Figura 9.** Biorreactor spinner 250 mL dentro de la cabina de flujo laminar.



**Fuente:** elaboración propia.

### 2.1.3 Métodos

Figura 10. Diagrama de la metodología.



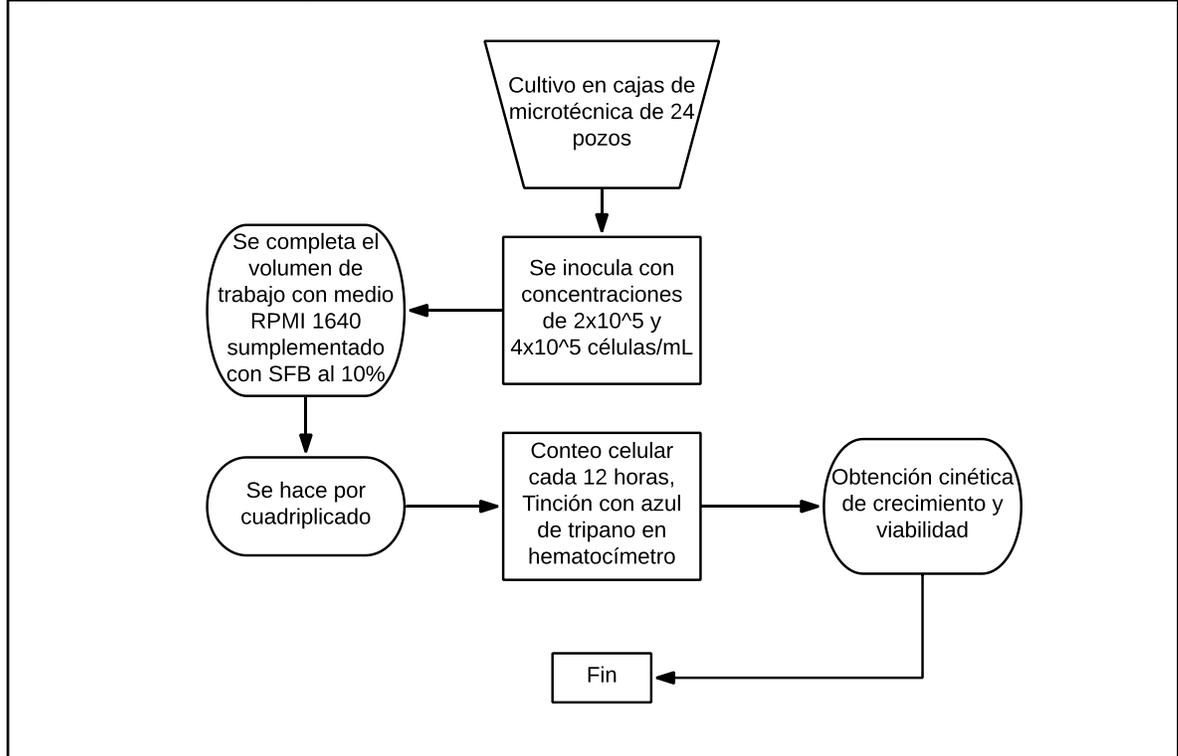
Fuente: elaboración propia.

**2.1.3.1 Cultivo, pasaje celular y descongelamiento.** Las células inicialmente están congeladas en nitrógeno líquido a  $-150^{\circ}\text{C}$  en viales crioprotectores, después de ser retirados se llevan inmediatamente a una incubadora a  $50^{\circ}\text{C}$  para evitar una muerte celular. Una vez las células se han descongelado, se pasan a un tubo cónico de 15 mL para centrifugarlo a 1200 rpm de 5 a 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y se agrega 2 mL de medio de cultivo RPMI 1640 para homogeneizar y poder ser cultivadas en una caja de Petri en una cabina de flujo laminar en condiciones estériles.

Al cabo de 24 horas se realiza conteo celular utilizando hematocimetro estándar y azul de tripano y si el número de células viables es cercano a  $5 \times 10^5$  células/mL, se pueden transferir a un frasco de cultivo de 25 mL. Se dejan proliferar hasta que la concentración celular sea de  $5 \times 10^5$  células/mL, realizando cambios de Medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Una vez alcanzada esta concentración se realizarán los pasajes necesarios para los distintos ensayos. Todo eso se realiza en condiciones estériles en cabina de flujo laminar. Las células son almacenadas en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa aproximada de 95%.

**2.1.3.2 Cultivo celular en microplaca.** Para hacer el experimento en microplacas de 24 pozos hay que tener en cuenta que cada pozo tiene un volumen de trabajo de 0,5 mL. Se inoculará un pozo con una concentración inicial de  $2 \times 10^5$  células/mL y otro con concentración inicial de  $4 \times 10^5$  células/mL, con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, cada pozo se realizará por cuadruplicado. La microplaca se colocará en una incubadora con control de  $\text{CO}_2$  al 5%, a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de 90% aproximadamente. Cada 12 horas se tomará una muestra de la suspensión celular (1mL) para realizar el conteo de células por medio de tinción por azul de tripano en microscopio invertido y usando Cámara de Neubauer. El cultivo se mantendrá hasta llegar al estado estacionario. A partir de los resultados obtenidos se espera determinar la concentración celular obtenida y la productividad. Ver **figura 11**

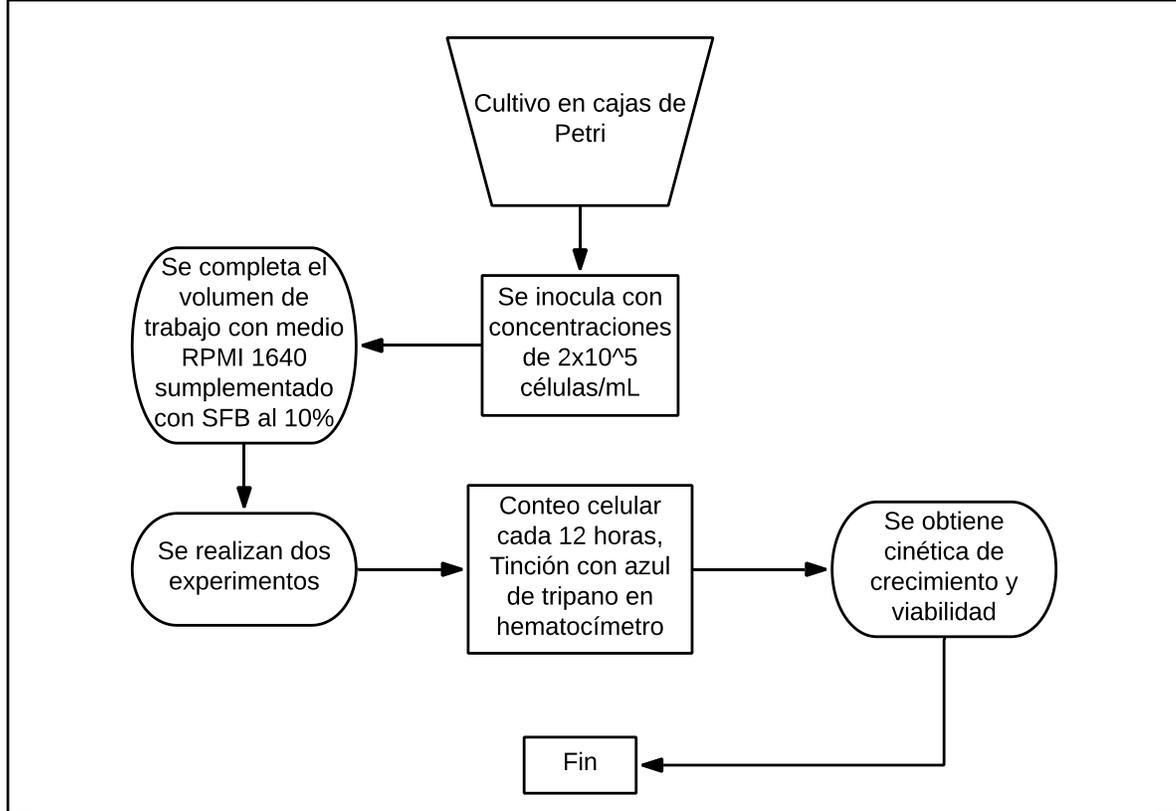
**Figura 11.** Metodología del cultivo celular en microplaca.



**Fuente:** elaboración propia.

**2.1.3.3 Cultivo celular en caja de Petri.** El cultivo celular en caja de Petri se inoculará con una concentración inicial de  $2 \times 10^5$  células/mL con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino completando un volumen de 20 mL, la caja de Petri se colocará en una incubadora con control de CO<sub>2</sub> al 5%, a una temperatura de 37°C y humedad relativa de 90% aproximadamente. Cada 12 horas se tomará una muestra de la suspensión celular (1 mL) para realizar el conteo de células por medio de tinción por azul de tripano en microscopio invertido y usando Cámara de Neubauer. A partir de los resultados obtenidos se espera determinar la concentración celular obtenida y la productividad. Ver **figura12**.

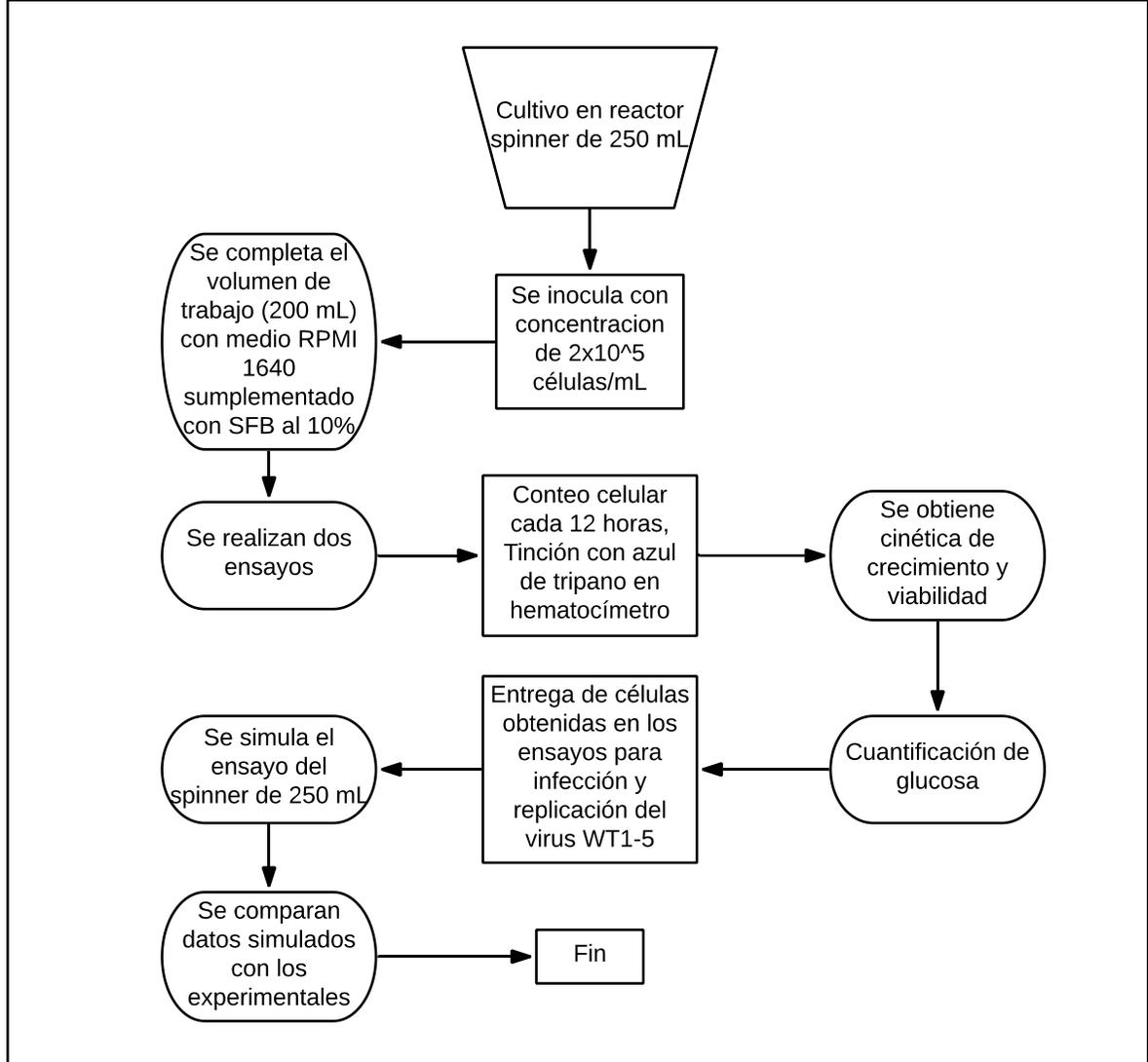
**Figura 12.** Metodología del cultivo celular en cajas de Petri.



**Fuente:** elaboración propia

**2.1.3.4 Cultivo celular en biorreactor Spinner de 250 mL.** Para el cultivo de las células en biorreactores spinner se parte de las células cultivadas en cajas de Petri. Se evaluará inicialmente en un biorreactor spinner (Corning) de 250 mL de capacidad. El biorreactor se inoculará con una concentración de células de  $2 \times 10^5$  células/mL con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino. El spinner se colocará en una incubadora con control de  $\text{CO}_2$  al 5%, a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , humedad relativa de 90% aproximadamente y con una agitación de 70 rpm. Cada 12 horas se tomará una muestra de la suspensión celular (1 mL) para realizar el conteo de células por medio de tinción por azul de tripano en microscopio invertido y usando Cámara de Neubauer. Adicionalmente, se medirán la concentración de glucosa por medio de la determinación de azúcares reductores por espectrofotometría (Método DNS). El cultivo se mantendrá hasta llegar al estado estacionario. Se realizará el cultivo por duplicado. A partir de los resultados obtenidos se espera determinar la concentración celular obtenida, la productividad y consumo de glucosa. Adicionalmente se determinará si el cambio de pH fue considerable o no. Se realizará la comparación con los resultados obtenidos en las escalas anteriores. Finalmente, las células obtenidas se entregarán para la producción del virus WT1-5. Ver **figura 13**.

**Figura 13.** Metodología del cultivo celular en biorreactor spinner.



Fuente: elaboración propia

## 2.2 CARACTERIZACION

**2.2.1 Recuento Celular.** El recuento celular es el método más utilizado ya que es un método simple y de bajo costo, el cuál además permite un seguimiento más detallado a la hora de la inspección visual.

Para este proyecto la herramienta utilizada para poder realizar el recuento celular fue el hematocímetro (cámara de neubauer), que se puede ser apreciado en la **figura 14**. Cuenta con una profundidad de 0,1 mm con reglilla de neubauer, la cual consta de 9 cuadrados con lados de 1mm (área total de recuento=0,9 mm<sup>2</sup>) cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0,1 µL. Los cuatro extremos están

subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de  $0,04 \text{ mm}^2$  ( $0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm}$ ), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños<sup>85</sup>.

**Figura 14.** Cámara de Neubauer.



**Fuente:** elaboración propia.

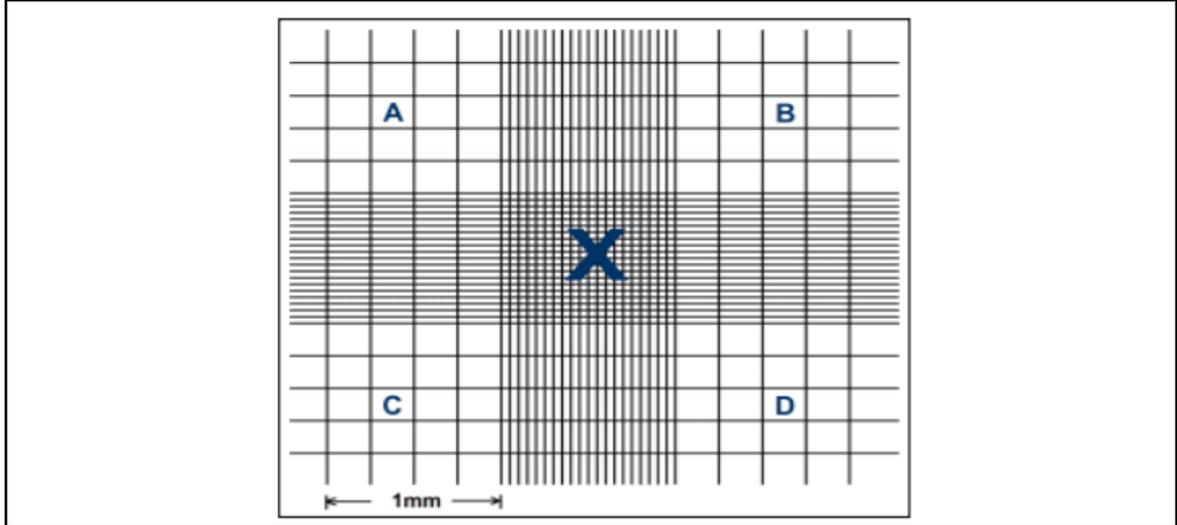
Para cada experimento se realiza cuantificación celular utilizando el hematocimetro contando las zonas A, B, C, D según la **figura 15** por medio de tinción con azul de tripano ya que este permite diferenciar las células vivas de las muertas. Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no son coloreados debido a que las células son muy selectivas con los compuestos que dejan atravesar su membrana<sup>86</sup>.

---

<sup>85</sup> ARREDONDO VEGA, Bertha O. y VOLTOLINA, Domenico. Concentración, Recuento Celular y Tasa de Crecimiento. En: MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL. [sitio web]. [Consulta 25 enero 2017]. Capítulo 2. 22p. Archivo en pdf. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/253237563\\_CONCENTRACION\\_RECUESTO\\_CELULAR\\_Y\\_TASA\\_DE\\_CRECIMIENTO](https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO)

<sup>86</sup> SLIDESHARE. [sitio web]. Técnicas de tinción más utilizadas en el campo de la histología. [Consulta: 30 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/medicinac/tcnicas-de-tincin>

**Figura 15.** Reglilla de cámara de Neubauer de 9 mm<sup>2</sup>.



**Fuente:** ARREDONDO VEGA, Bertha O. y VOLTOLINA, Domenico. Concentración, Recuento Celular y Tasa de Crecimiento. En: MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL. [sitio web]. [Consulta 25 enero 2017]. Capítulo 2. p.22. Archivo en pdf. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/253237563\\_CONCENTRACION\\_RECUESTO\\_CELULAR\\_Y\\_TASA\\_DE\\_CRECIMIENTO](https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO)

En las células viables, el azul de tripano no es absorbido; sin embargo, atraviesa la membrana de las células muertas por esta razón las células muertas vistas en el microscopio se muestran de color azul<sup>87</sup>.

Luego de contar en cada cuadrante se calcula el número de células/mL que tenemos con la siguiente fórmula:

**Ecuación 1.** Recuento celular.

$$\frac{\# \text{ de células en los 4 cuadrantes}}{4} \times 2 \times 10000 = \text{Total de células} \left( \frac{\text{cells}}{\text{ml}} \right)$$

**Fuente:** ARREDONDO VEGA, Bertha O. y VOLTOLINA, Domenico. Concentración, Recuento Celular y Tasa de Crecimiento. En: MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL. [sitio web]. [Consulta 25 enero 2017]. Capítulo 2. p. 24. Archivo en pdf. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/253237563\\_CONCENTRACION\\_RECUESTO\\_CELULAR\\_Y\\_TASA\\_DE\\_CRECIMIENTO](https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO)

<sup>87</sup> SLIDESHARE. Op. cit. p. 15.

Tomando en cuenta lo anterior, se obtiene el número total de células, el cual es la suma de las células viables y células muertas, para obtener el porcentaje de viabilidad.

**2.2.2 Cuantificación Celular.** Para la cuantificación celular y análisis de viabilidad para cada experimento realizado se calcula la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) que corresponde a la curva de crecimiento en función del tiempo y la velocidad máxima específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) que corresponde a la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial de crecimiento; con esto se calcula el tiempo de duplicación ( $T_d$ ) del crecimiento celular<sup>88</sup>. Las ecuaciones utilizadas son las siguientes:

**Ecuación 2.** Concentración de células viables.

$$\mu = \frac{1}{X_v} \frac{dX_v}{dt}$$

**Fuente:** MARTINEZ SALAZAR, Verónica Sofía. Optimización del cultivo de células HEK293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus. [en línea]. Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas, 2007. [Consultado 13 enero 2019]. p. 25.

**Ecuación 3.** Velocidad específica de crecimiento.

$$X_v = X \times V$$

**Fuente:** MARTINEZ SALAZAR, Verónica Sofía. Optimización del cultivo de células HEK293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus. [en línea]. Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas, 2007. [Consultado 13 enero 2019]. p. 25.

**Ecuación 4.** Tiempo de duplicación.

$$T_d = \frac{1}{\mu_{max}} \times \ln(2)$$

**Fuente:** MARTINEZ SALAZAR, Verónica Sofía. Optimización del cultivo de células HEK293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus. [en línea]. Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas, 2007. [Consultado 13 enero 2019]. p. 25.

Donde X corresponde a la concentración de células viables y V es el volumen en el que se encuentran estas células.

---

<sup>88</sup> MARTINEZ SALAZAR. Op. Cit., p.24.

**2.2.3 Cuantificación de glucosa.** La cuantificación de glucosa de las muestras obtenidas del biorreactor spinner de 250 mL se llevó a cabo el método DNS que se encarga de la determinación de azúcares reductores mediante ácido dinitrosalicílico. Esta prueba fue realizada en el laboratorio de química de la universidad ECCI.

En este método analítico el DNS está en exceso frente a los grupos reductores ya en todas las muestras se adiciona la misma cantidad, de tal forma que mayores concentraciones de azúcares reductores provocan una mayor coloración de la muestra; estas diferencias de coloración pueden determinarse por espectrofotometría visible, a la longitud de onda máxima de absorbancia de 540 nm<sup>89</sup>. Para llevar a cabo este método se tuvo en cuenta el **protocolo 4 (Anexo D)** donde se explica el paso a paso para realizar este procedimiento.

La curva de calibración es la representación gráfica en un eje de coordenadas, de la absorbancia (eje de ordenadas: Y) frente a la concentración (eje de abscisas: X), la curva patrón de la glucosa se construye ensayando varias soluciones de concentración conocida y determinando sus respectivas absorbancias dando como resultado una recta<sup>90</sup>. La concentración de una solución en este caso las muestras del biorreactor spinner se averiguan por la interpolación de las Abs de la solución en la curva de calibración, o a través de la **ecuación 5**:

**Ecuación 5.** Ecuación de la recta.

$$y: (mx + b)$$

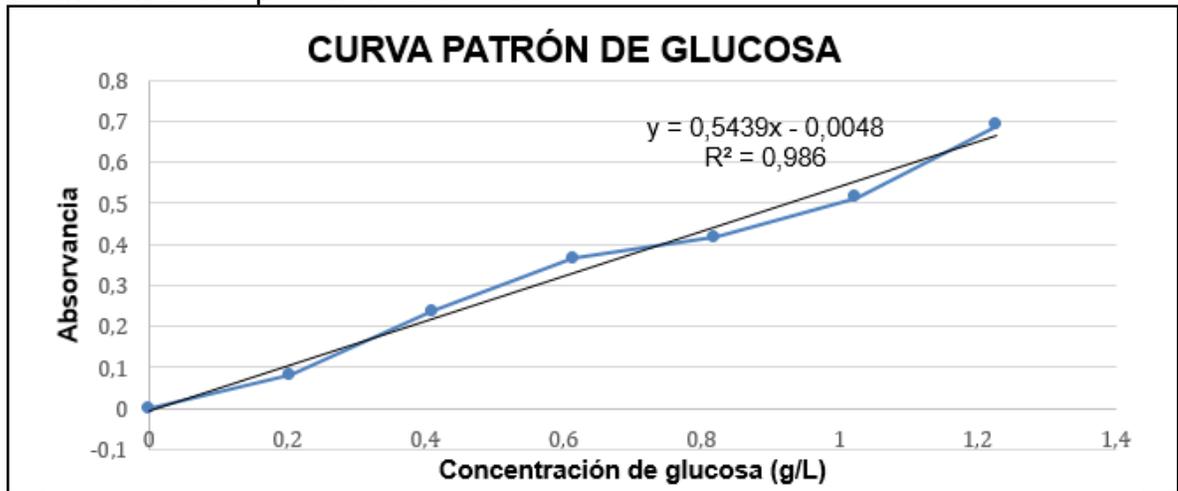
**Fuente:** SLIDESHARE. [sitio web]. Determinación de azúcares reductores por espectrofotometría (Método DNS). [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/vegabner/determinacin-de-azcares-reductores-por-espectrofotometra-mtodo-dns>

Dónde: Absorbancia (y) = constante (m) x concentración + absorbancia del blanco; para este proyecto se utilizó la curva patrón de glucosa ya obtenida por las estudiantes Alejandra Lara y Edna Méndez construida para el proyecto de grado: Evaluación de la producción de hidrógeno en un biorreactor a escala banco empleando bacterias de la especie *Clostridium butyricum* a partir de cáscara de banana (*Musa cavendish*) que se observa en la **Gráfica 1** a partir de la ecuación arrojada por la curva patrón se cuantificó la glucosa de las muestras obtenidas en el experimento del biorreactor spinner de 250 mL.

<sup>89</sup> ANALISIS DE ALIMENTOS. [sitio web]. Método de DNS. [Consulta: 14 diciembre 2018]. Disponible en: <http://metodosdeanalisisdealimentos.blogspot.com/2018/04/proposito-elmetodo-dns-acido.html>

<sup>90</sup> SLIDESHARE. Op. cit., p. 3.

**Gráfica 1.** Curva patrón de Glucosa.



Fuente: elaboración propia

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se analizarán los resultados en el orden en el que se realizaron los diferentes experimentos para la producción de células REH, desde el cultivo en microplacas de 24 pozos hasta el biorreactor spinner de 250 mL, seguido por la simulación y posterior comparación con los resultados obtenidos de manera experimental. Adicionalmente, la evaluación del crecimiento celular en cada una de las escalas no alcanzó una fase estacionaria evitando que los metabolitos generados alteraran la cinética de crecimiento, puesto que las células producidas debían ser entregadas en fase de crecimiento exponencial, para posterior infección y replicación del virus WT1-5.

Las concentraciones de células viables y células totales obtenidas en cada uno de los experimentos se muestran en cada una de sus respectivas tablas, en donde a partir de estos datos se obtendrán los porcentajes de viabilidad. Cada tabla tiene su respectiva gráfica en donde se muestran las cinéticas de crecimiento en escala semilogarítmica (puntos de color azul) y el porcentaje de viabilidad (línea de color naranja), en donde a partir de la derivada de la ecuación exponencial de la concentración celular se obtiene en cada punto la productividad celular, es decir, el cambio de biomasa con relación al tiempo.

#### 3.1 CULTIVO EN MICROPLACAS DE 24 POZOS

**3.1.1 Cinética y viabilidad celular.** El experimento 1 tiene una duración de 72 horas (3 días), el cual se realizó en microplacas de 24 pozos, con una concentración inicial de  $2 \times 10^5$  células/mL, por cuadruplicado. Al mismo tiempo, se cultivó en la misma microplaca el experimento 2, que tiene una misma duración, una concentración inicial de  $4 \times 10^5$  células/mL, también por cuadruplicado. En las tablas que se encuentran a continuación se presentan las concentraciones obtenidas en los 4 ensayos del experimento 1 y 2 respectivamente.

**Tabla 1.** Cuadruplicado del experimento 1 en microplaca de 24 pozos.

Tiempo (h)	Ensayo 1 (Cells/mL)	Ensayo 2 (Cells/mL)	Ensayo 3 (Cells/mL)	Ensayo 4 (Cells/mL)
0	268.889	284.444	235.556	257.778
12	302.222	275.556	324.444	267.778
24	308.889	322.222	315.556	335.556
36	386.667	315.556	340.000	393.333
48	380.000	393.333	373.333	482.222
60	573.333	475.556	428.889	453.333
72	602.222	555.556	437.778	686.667

Fuente: elaboración propia

**Tabla 2.** Cuadruplicado del experimento 2 en microplaca de 24 pozos.

Tiempo (h)	Ensayo 1 (Cells/mL)	Ensayo 2 (Cells/mL)	Ensayo 3 (Cells/mL)	Ensayo 4 (Cells/mL)
0	541.111	507.778	550.000	573.333
12	766.667	644.444	711.111	603.333
24	775.000	650.000	660.000	650.000
36	875.000	855.000	800.000	890.000
48	1.220.000	1.100.000	920.000	1.005.000
60	1.215.000	1.125.000	1.255.000	1.100.000
72	1.320.000	960.000	1.135.000	1.215.000

**Fuente:** elaboración propia

En las siguientes tablas se muestran el promedio de concentraciones celulares del cuadruplicado de los experimentos 1 y 2 con su respectiva desviación estándar ( $s$ ) y varianza ( $s^2$ ), con el fin de saber qué tan dispersos se encuentran los datos obtenidos experimentalmente con respecto a la media.

**Tabla 3.** Promedio, desviación estándar y varianza del experimento 1 en microplaca de 24 pozos.

Tiempo (h)	X (Cells/mL)	s (Cells/mL)	$s^2$ (Cells <sup>2</sup> /mL <sup>2</sup> )
0	261.667	20.558	422.633.745
12	292.500	25.905	671.090.535
24	320.556	11.386	129.629.630
36	358.889	37.384	1.397.530.864
48	407.222	50.687	2.569.135.802
60	482.778	63.307	4.007.818.930
72	570.556	103.826	10.779.835.391

**Fuente:** elaboración propia.

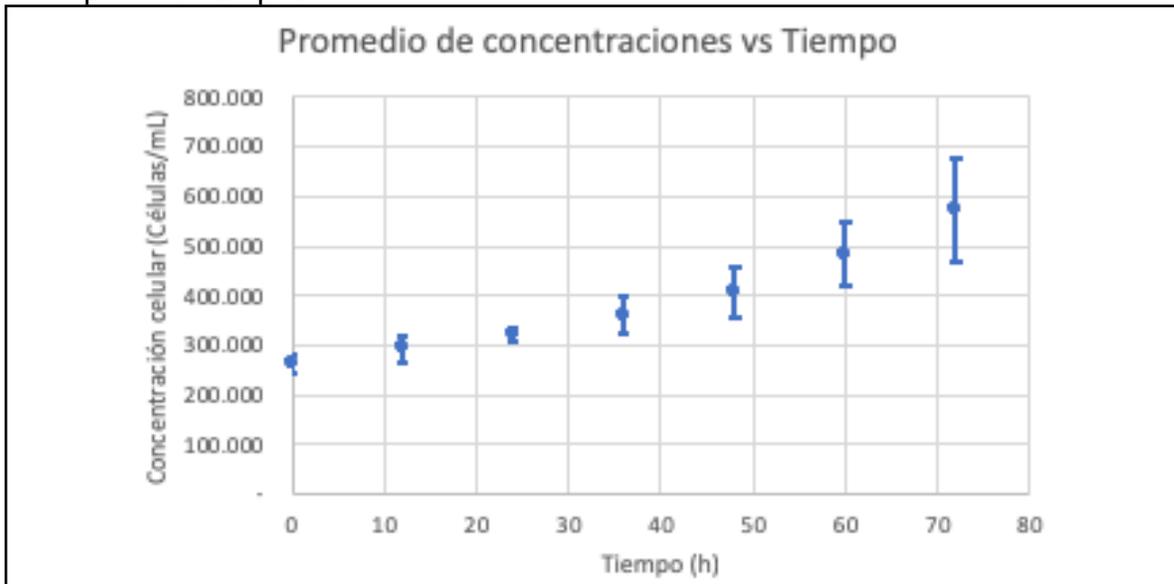
**Tabla 4.** Promedio, desviación estándar y varianza del experimento 1 en microplaca de 24 pozos.

Tiempo (h)	X (Cells/mL)	s (Cells/mL)	s <sup>2</sup> (Cells <sup>2</sup> /mL <sup>2</sup> )
0	543.056	27.162	737.757.202
12	681.389	72.142	5.204.423.868
24	683.750	61.016	3.722.916.667
36	855.000	39.370	1.550.000.000
48	1.061.250	128.865	16.606.250.000
60	1.173.750	73.300	5.372.916.667
72	1.157.500	151.905	23.075.000.000

**Fuente:** elaboración propia.

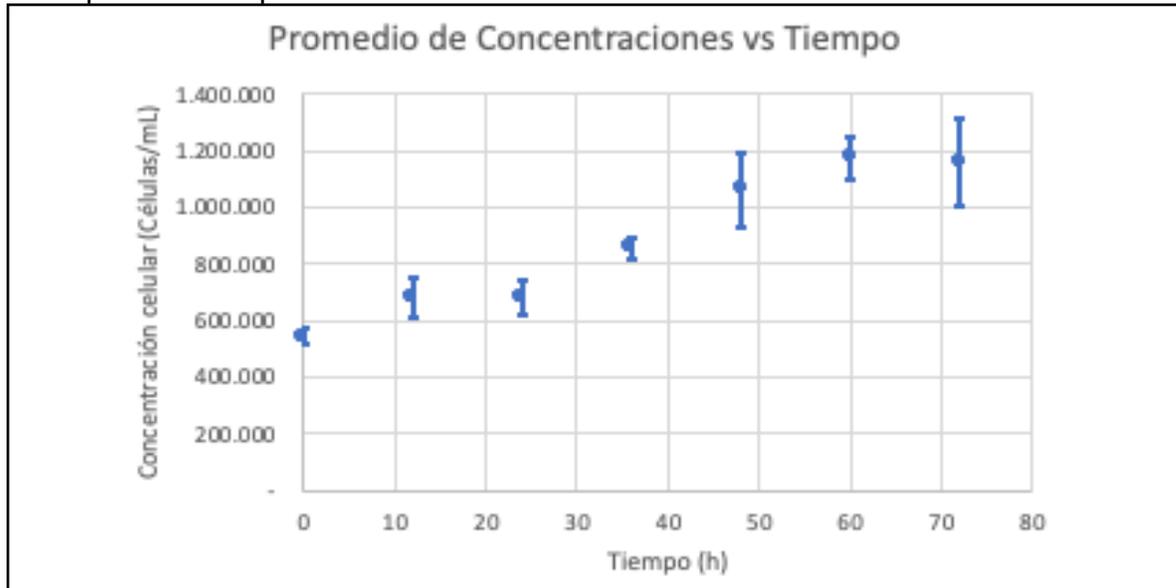
A partir de lo anterior se grafica el promedio de concentraciones celulares con su respectiva desviación estándar (s) para ilustrar cómo es el comportamiento con respecto al tiempo.

**Gráfica 2.** Concentración celular y desviación estándar en experimento 1 en microplaca de 24 pozos.



**Fuente:** elaboración propia

**Gráfica 3.** Concentración celular y desviación estándar en experimento 2 en microplaca de 24 pozos.



**Fuente:** elaboración propia

Según las gráficas anteriores, tanto en el experimento 1 como en el experimento 2 las concentraciones celulares se comportan de una manera muy similar, debido que a medida que aumenta la concentración los datos tienden a dispersarse más, pero el rango en el que fluctúan las concentraciones al final no es significativo siendo  $\pm 1,5 \times 10^5$  células/mL la dispersión más alta en donde se obtuvo la concentración celular más alta (72 h en el experimento 2).

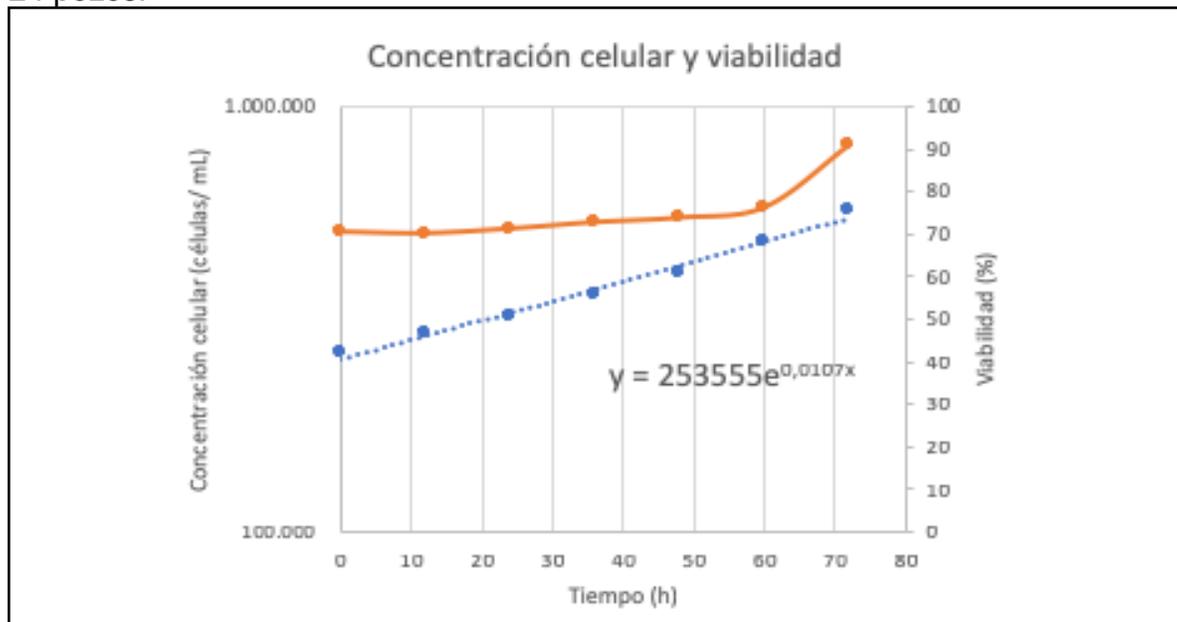
También se obtienen los datos que se muestran en **las tablas 5 y 6**, realizando las respectivas gráficas de concentración celular y viabilidad, (**Graficas 4 y 5**)

**Tabla 5.** Experimento 1 en microplaca de 24 pozos.

	<b>Células Viables</b>	<b>Células Muertas</b>	<b>Celulas Totales</b>	<b>Viabilidad</b>	<b>Productividad</b>
Tiempo (h)	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	%	(Cells/ml·h)
0	261.667	110.000	371.667	70,40	2713,0
12	292.500	125.000	417.500	70,06	3084,7
24	320.556	130.000	450.556	71,15	3507,4
36	358.889	135.000	493.889	72,67	3987,9
48	407.222	145.000	552.222	73,74	4534,3
60	482.778	150.000	632.778	76,29	5155,5
72	570.556	55.000	625.556	91,21	5861,9

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 4.** Concentración celular y viabilidad del experimento 1 en microplaca de 24 pozos.



**Fuente:** elaboración propia.

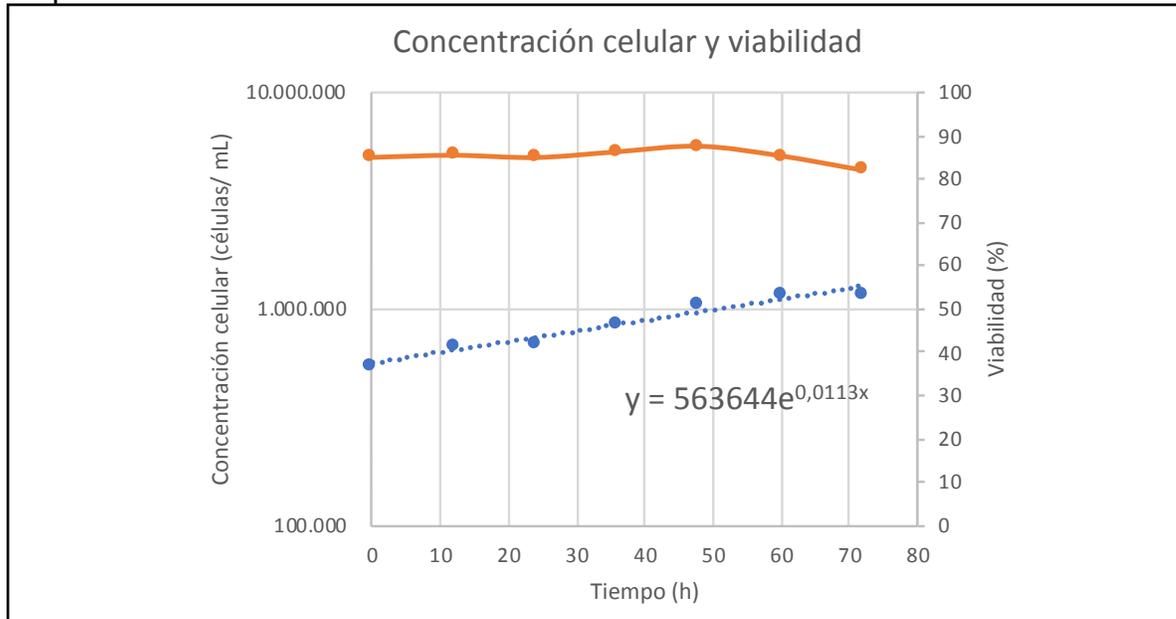
A partir de los datos obtenidos del experimento 1 que se muestran en la **tabla 5**, se realiza la gráfica de concentración celular y viabilidad que se aprecia en la **gráfica 4**, en donde se muestra el comportamiento de las células REH. Durante toda la curva la viabilidad se encuentra por el 75,1%. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) es de  $0,0107 \text{ h}^{-1}$ , por lo que el tiempo de duplicación es de 64,8 horas.

**Tabla 6.** Experimento 2 en microplaca de 24 pozos.

Tiempo (h)	Células Viables Concentración (cells/ml)	Células Muertas Concentración (cells/ml)	Celulas Totales Concentración (cells/ml)	Viabilidad %	Productividad (Cells/ml-h)
0	543.056	95.000	638.056	85,11	6369,2
12	681.389	115.000	796.389	85,56	7294,1
24	683.750	120.000	803.750	85,07	8353,4
36	855.000	135.000	990.000	86,36	9566,5
48	1.061.250	150.000	1.211.250	87,62	10955,8
60	1.173.750	200.000	1.373.750	85,44	12546,9
72	1.157.500	250.000	1.407.500	82,24	14369,0

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 5.** Concentración celular y viabilidad del experimento 2 en microplaca de 24 pozos.



**Fuente:** elaboración propia.

Según la **gráfica 3** realizada a partir de los valores obtenidos en el experimento 2 (**tabla 2**), se puede observar que la viabilidad durante la curva es del 85,3%, siendo mayor que la viabilidad obtenida en el experimento 1. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) es de  $0,0113 \text{ h}^{-1}$  y por lo tanto el tiempo de duplicación es de 61,3 horas. Se puede ver una diferencia poco significativa con respecto a los resultados del experimento 1, siendo el experimento 2, el que mayor concentración de células iniciales tenía, el que mayor velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) obtuvo y por lo tanto el de menor tiempo de duplicación. Este comportamiento similar de velocidades específicas de crecimiento se debe a que las células se cultivaron con el mismo inóculo, además, las productividades tuvieron un comportamiento normal por el hecho de que a medida que avanza el tiempo aumenta la concentración celular.

### 3.2 CULTIVO EN CAJA DE PETRI

El experimento en la caja de Petri se realiza con una concentración inicial de células de  $2 \times 10^5$  células/mL y con un volumen de trabajo de 20 mL. A continuación, se muestran las tablas con los datos obtenidos y sus respectivas gráficas.

**3.2.1 Cinética y viabilidad celular.** En el primer experimento y según los datos obtenidos (**tabla 7**), se realizó la curva de crecimiento, tal como se muestra en la **gráfica 6**, la cual tuvo una duración de 144 horas (6 días), en donde la viabilidad comenzó con un mínimo de 79,1% y se fue elevando, llegando a un promedio de

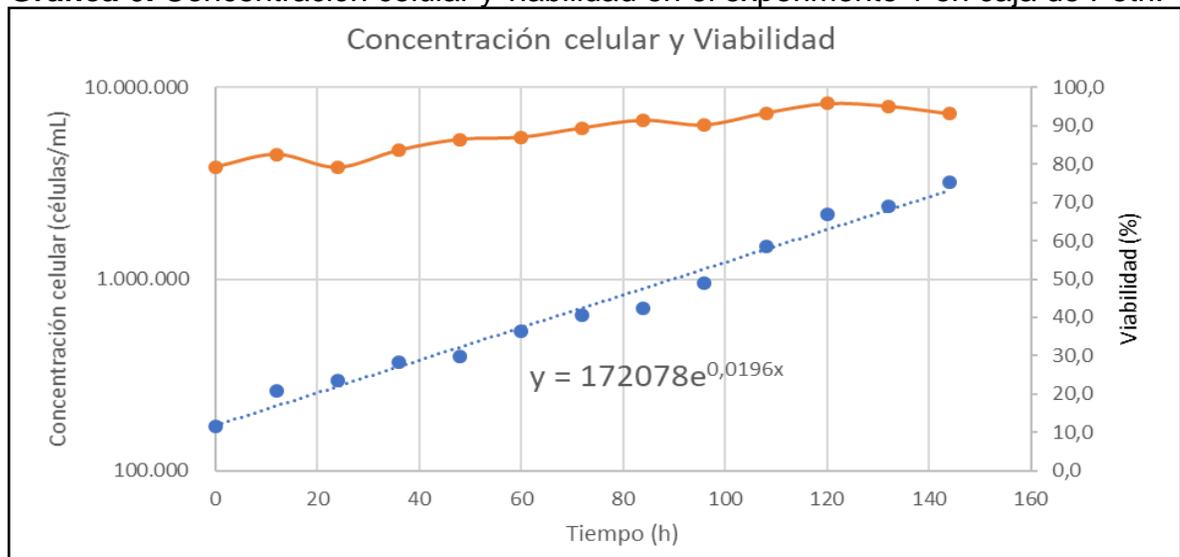
88,2% al finalizar el experimento. La velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) fue de  $0,0196 \text{ h}^{-1}$ , el tiempo de duplicación de 35,36 horas y la máxima concentración de células viables en el tiempo trabajado fue de  $3,18 \times 10^6$  células/mL, teniendo un total aproximado de  $6,37 \times 10^7$  células en 20mL.

**Tabla 7.** Experimento 1 en caja de Petri.

Tiempo (h)	Células Viables	Células muertas	Celulas Totales	Viabilidad	Productividad
	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	%	(Cells/ml·h)
0	171.250	45.000	216.250	79,2	3372,7
12	260.000	55.000	315.000	82,5	4267,0
24	293.750	77.500	371.250	79,1	5398,5
36	370.000	72.500	442.500	83,6	6830,0
48	396.000	62.000	458.000	86,5	8641,0
60	536.250	80.000	616.250	87,0	10932,3
72	647.500	76.250	723.750	89,5	13831,1
84	700.015	65.000	765.015	91,5	17498,6
96	948.750	102.500	1.051.250	90,2	22138,6
108	1.481.667	105.000	1.586.667	93,4	28008,9
120	2.178.333	95.000	2.273.333	95,8	35435,8
132	2.398.333	121.667	2.520.000	95,2	44832,0
144	3.182.500	232.500	3.415.000	93,2	56719,7

Fuente: elaboración propia.

**Gráfica 6.** Concentración celular y viabilidad en el experimento 1 en caja de Petri.



Fuente: elaboración propia.

El segundo experimento tuvo una duración de 144 horas (6 días), los datos obtenidos se muestran en la **tabla 7**, se realizó la respectiva curva de crecimiento que se muestra en la **gráfica 6**, en donde la viabilidad celular tuvo un promedio de 89,6% al finalizar el experimento. La velocidad específica máxima de crecimiento fue de  $0,0168 \text{ h}^{-1}$  por lo que el tiempo de duplicación es de 41,26 horas y la

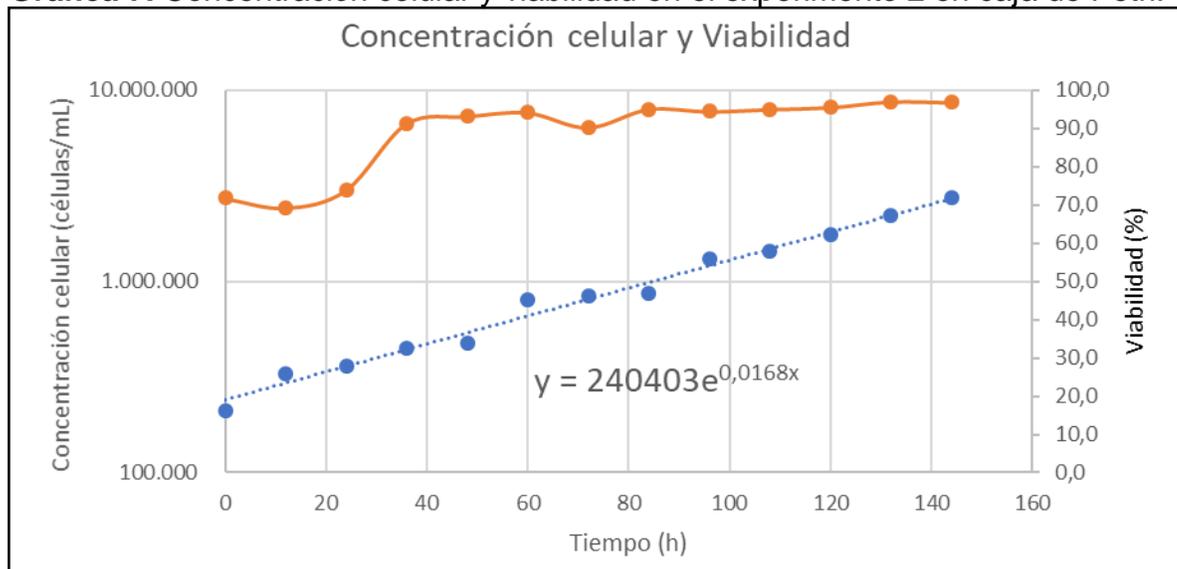
concentración máxima de células viables durante las 144 horas que se obtuvo fue de  $2,74 \times 10^6$  células/mL teniendo así un total de  $5,47 \times 10^7$  células en 20 mL.

**Tabla 8.** Experimento 2 en caja de Petri.

Tiempo (h)	Células Viables	Células muertas	Celulas Totales	Viabilidad	Productividad
	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	%	(Cells/ml-h)
0	211.667	83.333	295.000	71,8	4038,8
12	330.000	146.667	476.667	69,2	4940,9
24	363.333	128.333	491.667	73,9	6044,4
36	445.000	42.500	487.500	91,3	7394,5
48	475.000	35.000	510.000	93,1	9046,2
60	805.000	50.000	855.000	94,2	11066,7
72	835.000	90.000	925.000	90,3	13538,5
84	865.000	45.000	910.000	95,1	16562,5
96	1.315.000	77.500	1.392.500	94,4	20261,9
108	1.427.306	75.000	1.502.306	95,0	24787,5
120	1.745.432	82.000	1.827.432	95,5	30324,0
132	2.206.788	68.333	2.275.121	97,0	37097,2
144	2.735.762	90.000	2.825.762	96,8	45383,1

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 7.** Concentración celular y viabilidad en el experimento 2 en caja de Petri.



**Fuente:** elaboración propia.

Se puede apreciar que los datos obtenidos en los experimentos en caja de petri arrojan gráficas y resultados muy diferentes a los que se obtuvieron en los experimentos en microplacas. Comenzando con la productividad, la cual fue muy superior, es decir que el comportamiento de la concentración celular a medida que aumentaba el tiempo fue muy positiva y se refleja en la concentración final (hora 144). Las velocidades específicas de crecimiento también presentaron diferencias

entre las dos escalas, siendo las de los experimentos en cajas de petri mayores por lo que los tiempos de duplicación disminuyeron.

La razón de estas diferencias es que en cajas de petri se trabajó el doble de tiempo, esto se debe a que las células en microplacas, en donde se trabajó con un volumen mucho menor, comenzaron a sufrir muerte celular ya que no tenían suficiente interacción con otras células debido a que al observarlas se encontraban muy separadas entre sí y esto impidió seguir tomando muestras para el recuento celular. Teniendo en cuenta lo anterior se puede afirmar que la interacción celular es muy importante y casi vital para la producción de cultivos celulares de la línea celular REH.

### 3.3 CULTIVO EN BIORREACTOR SPINNER DE 100ML

Se realizó el experimento en el biorreactor spinner de 100 mL, que se muestra en la **figura 16**, el cual contaba con un agitador magnético recto y flexible. Se agitó a 60 RPM en una incubadora a 38°C, 70% de humedad relativa y 5% CO<sub>2</sub>.

**Figura 16.** Biorreactor Spinner de 100 mL.



**Fuente.** elaboración propia.

A las 36 horas exactamente después de haber inoculado el biorreactor se comenzaron a observar aglomeraciones de un tamaño de 8 a 10 mm dentro del reactor por lo que se dificultó la obtención de muestras para realizar un conteo celular que se considerara válido.

Según Martínez Salazar<sup>91</sup> en su trabajo de investigación que lleva por nombre optimización del cultivo de células HEK293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus utilizó una línea celular diferente a las trabajadas en este proyecto, de células embrionarias de riñón humano (HEK, Human Embryonic Kidney cells); en la fase de adaptación de células a crecimiento en suspensión se cultivaron las células, en donde se notaron aglomeraciones de manera similar a lo que ocurrió en el biorreactor spinner de 100 mL. Con el fin de eliminar o disminuir el tamaño de los aglomerados, se trabajó con suplementos tales como heparina sódica y glucanato férrico y se hicieron los respectivos experimentos en paralelo con distintos inóculos, comparando el crecimiento con y sin suplementos, en donde, en los cultivos que utilizó medio con suplemento, se notó una gran disminución de las aglomeraciones, pero afectó la viabilidad y concentración máxima celular.

Por esta razón, se comenzaron a evaluar variables como la velocidad de agitación o el tipo de agitador del reactor con el fin de evitar dichas aglomeraciones, sin necesidad de utilizar suplementos, que como ya se evidenció, afectarían la viabilidad y la concentración celular máxima.

Teniendo en cuenta lo anterior se decidió cambiar a un biorreactor spinner (Corning) con un volumen de trabajo de 250 mL con un agitador magnético con deflectores, con el fin de que la agitación rompa el flujo laminar y mejore la circulación para evitar que se formen aglomeraciones.

### **3.4 CULTIVO EN BIORREACTOR SPINNER DE 250 ML**

Se realizaron dos experimentos en el biorreactor spinner con células REH que crecen en suspensión a 80 RPM en una incubadora a 38°C, más de 80% de humedad relativa y 5% CO<sub>2</sub> con un volumen de trabajo de 200 mL, para obtener su respectiva curva de crecimiento y viabilidad celular, además de las concentraciones de glucosa.

**3.4.1 Cinética y viabilidad celular.** A continuación, se muestra la **tabla 9** y la respectiva grafica (**gráfica 8**) con los datos obtenidos en el primer experimento. Durante la curva de crecimiento, que tuvo una duración de 144 horas (6 días), la viabilidad se encuentra por el 90,3%. La velocidad específica máxima de crecimiento es de 0,0203 h<sup>-1</sup> por lo que el tiempo de duplicación es de 34,15 horas y la concentración máxima obtenida de células viables fue de 2,89x10<sup>6</sup> células/mL durante las 144 horas trabajadas obteniendo un total de 5,78x10<sup>8</sup> células en 200 mL.

---

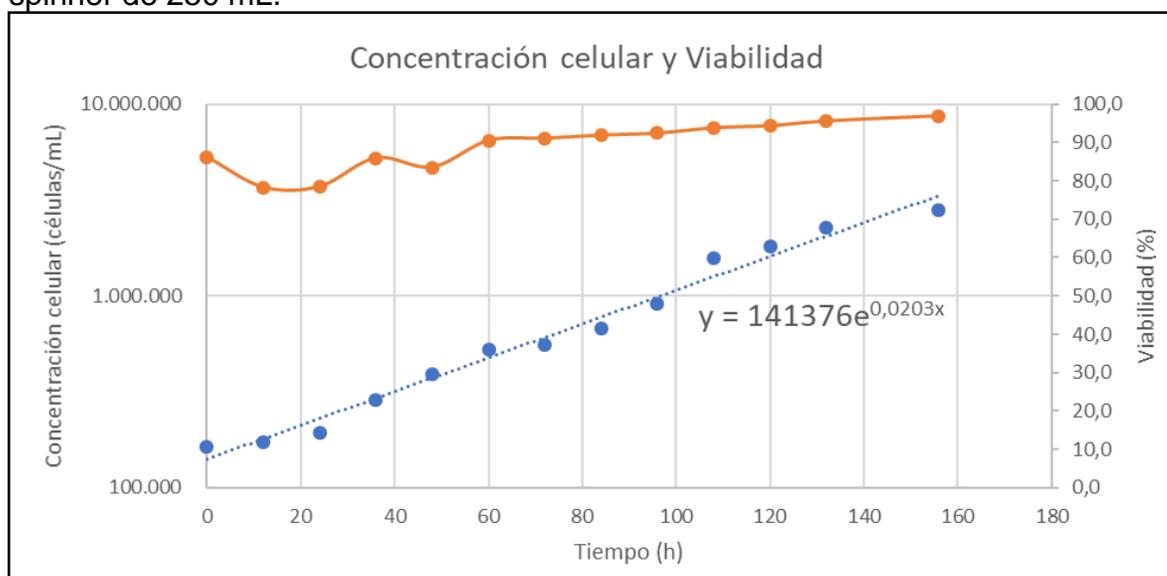
<sup>91</sup> MARTINEZ SALAZAR. Op. cit., 41.

**Tabla 9.** Experimento 1 en el biorreactor spinner de 250 mL.

Tiempo (h)	Células Viables	Células muertas	Celulas Totales	Viabilidad	Productividad
	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	%	(Cells/ml-h)
0	163.243	26.250	189.493	86,1	2869,9
12	173.928	48.333	222.261	78,3	3661,6
24	193.947	53.333	247.280	78,4	4671,5
36	285.013	46.667	331.680	85,9	5960,1
48	388.573	76.667	465.240	83,5	7604,1
60	523.975	55.000	578.975	90,5	9701,6
72	558.721	55.000	613.721	91,0	12377,6
84	678.852	60.000	738.852	91,9	15791,8
96	909.503	75.000	984.503	92,4	20147,7
108	1.570.288	104.167	1.674.455	93,8	25705,1
120	1.803.493	108.333	1.911.826	94,3	32795,4
132	2.260.720	105.000	2.365.720	95,6	41841,5
144	2.802.253	89.167	2.891.420	96,9	53382,8

Fuente: elaboración propia.

**Gráfica 8.** Concentración celular y viabilidad en el experimento 1 en el biorreactor spinner de 250 mL.



Fuente: elaboración propia.

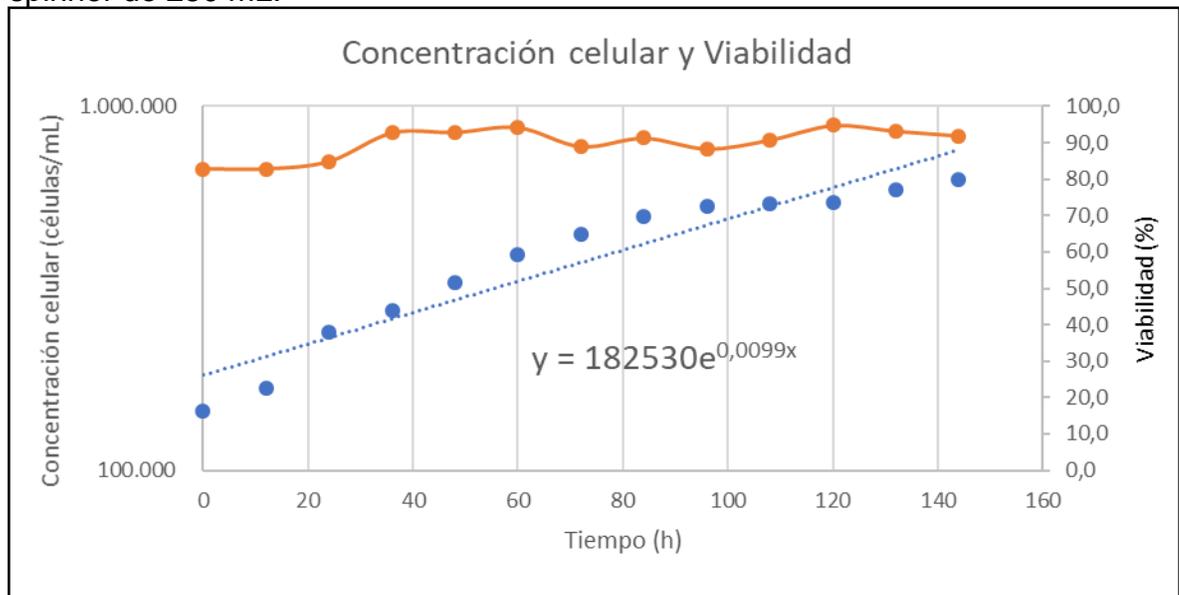
El segundo experimento tuvo una duración de 144 horas (6 días), donde según los datos obtenidos se muestran en la **tabla 10** y se realizó la correspondiente curva de crecimiento (**gráfica 9**), teniendo una viabilidad del 90% durante todo el proceso. La velocidad específica máxima de crecimiento fue de  $0,0099 \text{ h}^{-1}$ , el tiempo de duplicación de 70,01 horas y una concentración máxima de células viables de  $6,22 \times 10^5$  células/mL en el tiempo y un número total de  $1,26 \times 10^8$  células en 200 mL al finalizar el experimento.

**Tabla 10.** Experimento 2 en el biorreactor spinner de 250 mL.

Tiempo (h)	Células Viables	Células muertas	Celulas Totales	Viabilidad	Productividad
	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	Concentración (cells/ml)	%	(Cells/ml-h)
0	145.000	30.000	175.000	82,9	1807,0
12	168.750	35.000	203.750	82,8	2035,0
24	238.750	42.500	281.250	84,9	2291,7
36	273.750	21.250	295.000	92,8	2580,8
48	328.750	25.000	353.750	92,9	2906,3
60	390.000	23.750	413.750	94,3	3273,0
72	443.750	55.000	498.750	89,0	3685,8
84	498.750	47.500	546.250	91,3	4150,8
96	530.000	70.000	600.000	88,3	4674,4
108	540.345	55.000	595.345	90,8	5264,0
120	545.432	30.000	575.432	94,8	5928,0
132	592.102	43.000	635.102	93,2	6675,8
144	628.098	55.000	683.098	91,9	7518,0

Fuente: elaboración propia.

**Gráfica 9.** Concentración celular y viabilidad en el experimento 2 en el biorreactor spinner de 250 mL.



Fuente: elaboración propia.

Como se puede observar, el segundo experimento no fue del todo exitoso en comparación del primero, teniendo en cuenta que el propósito de este proyecto es la producción masiva de células.

La diferencia de los resultados obtenidos en los dos ensayos es significativa, esto se debe a que no se trabajó con el mismo inóculo inicial de células, por lo que se evidencia que las células no tienen el mismo comportamiento, aunque las condiciones en las que se trabajó hayan sido las mismas. Este es un inconveniente

muy común porque suelen presentarse problemas de inestabilidad genética cuando se realizan varios pasajes de cultivos de células no transformados, teniendo como consecuencia una gran heterogeneidad en el crecimiento de las células y en su diferenciación.

Como se observa en la **tabla 11**, el experimento 1 de la caja de Petri se obtuvo una velocidad específica máxima de crecimiento de  $0,0203 \text{ h}^{-1}$  y el tiempo de duplicación de 34,15 horas. Estos valores son muy similares, casi iguales, a los obtenidos en el experimento 1 del biorreactor spinner de 250 mL ( $\mu_{\text{max}} = 0,0203 \text{ h}^{-1}$  y  $t_d = 34,15 \text{ h}$ ). Este comportamiento se debe a que se trabajó con el mismo inóculo inicial de células para la caja de Petri y el biorreactor spinner de 250 mL.

**Tabla 11.** Producción de células REH en diferentes escalas.

Experimento	$\mu_{\text{max}}$ [1/h]	$t_d$ [h]	[ ] Celular inicial	[ ] Celular final	Células total
1. Microplaca 24 pozos	0,0107	64,78	1,00,E+05	5,71,E+05	2,85,E+05
2. Microplaca 24 pozos	0,0113	61,34	2,00,E+05	1,16,E+06	5,79,E+05
1. Caja de petri	0,0196	35,36	2,00,E+05	3,18,E+06	6,37,E+07
2. Caja de petri	0,0168	41,26	2,00,E+05	2,74,E+06	5,47,E+07
1. Reactor spinner 250	0,0203	34,15	2,00,E+05	2,89,E+06	5,78,E+08
2. Reactor spinner 250	0,0099	70,01	2,00,E+05	6,28,E+05	1,26,E+08

**Fuente:** elaboración propia.

Según la **tabla 11**, si requieren concentraciones altas de células REH, es recomendable cultivar en el biorreactor spinner de 250 mL que trabajar con numerosas cajas de Petri, puesto que esto significa menor riesgo de contaminación, menos material y herramientas a utilizar y más homogeneidad en concentraciones celulares y viabilidad.

**3.4.2 Consumo de glucosa.** Además de obtener la cinética de crecimiento y la viabilidad de las células REH se cuantificó la glucosa por medio del método DNS para obtener la concentración de azúcares reductores de las muestras obtenidas durante los conteos celulares realizados del biorreactor spinner de 250 mL, con los cuales se realizaron los perfiles de glucosa durante el crecimiento celular.

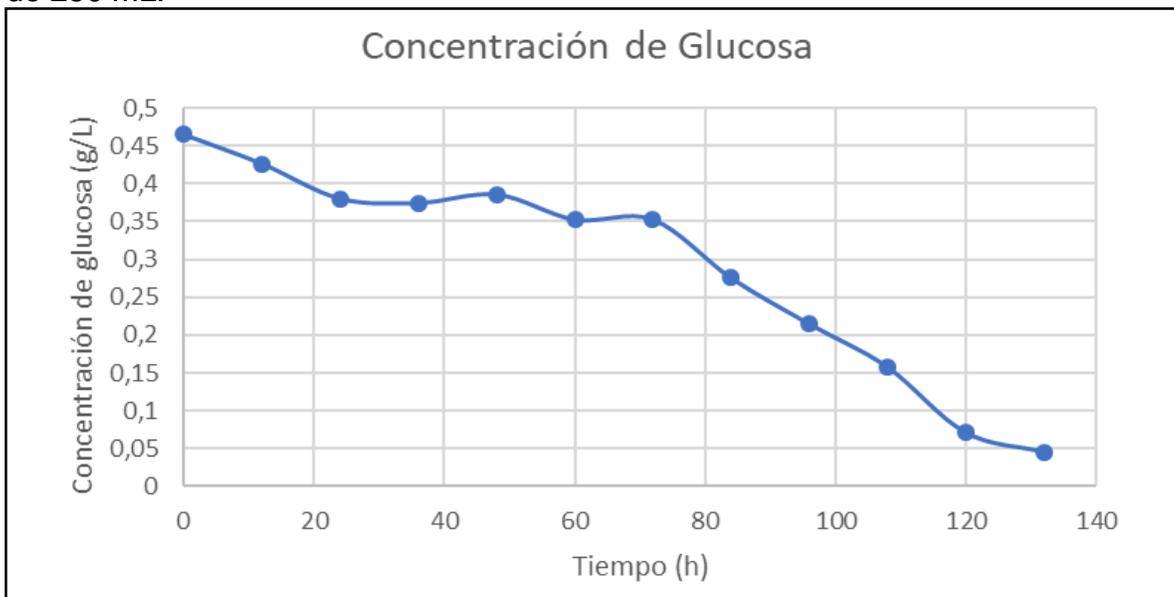
A continuación, se muestra en la **tabla 12** los datos obtenidos del primer experimento y en la **tabla 13** el segundo experimento, con su respectiva gráfica (**graficas 10 y 11**).

**Tabla 12.** Absorbancia y concentración de azúcares en el experimento 1 en el biorreactor spinner de 250 mL.

Hora	Abs	Glucosa (g/L)
0	0,25	0,4647913
12	0,23	0,4261813
24	0,2	0,380217
36	0,2	0,3747012
48	0,21	0,3857327
60	0,19	0,3526384
72	0,19	0,3526384
84	0,15	0,2754183
96	0,11	0,2147454
108	0,08	0,1577496
120	0,03	0,0713366
132	0,02	0,0455966

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 10.** Concentración de glucosa en el experimento 1 del biorreactor spinner de 250 mL.



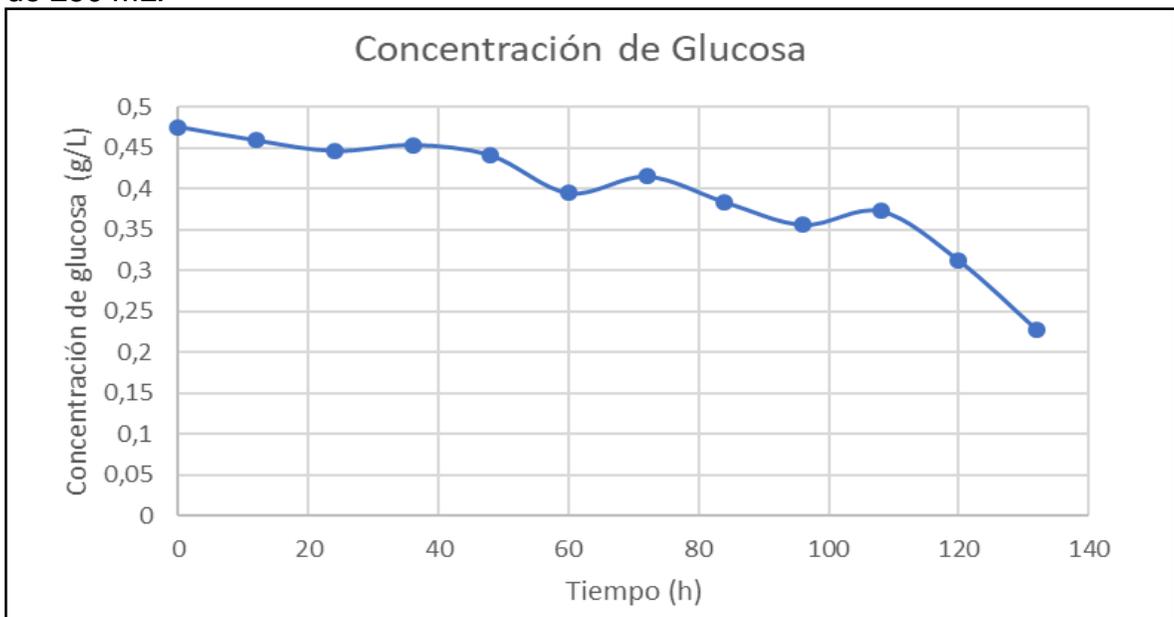
**Fuente:** elaboración propia.

**Tabla 13.** Absorbancia y concentración de azúcares en el experimento 2 en el biorreactor spinner de 250 mL.

Hora	Abs	Glucosa (g/L)
0	0,25	0,4758228
12	0,25	0,4592756
24	0,24	0,4464056
36	0,24	0,4537599
48	0,24	0,4408899
60	0,21	0,3949255
72	0,22	0,4151498
84	0,2	0,3838941
96	0,19	0,3563155
108	0,2	0,3728627
120	0,17	0,3121897
132	0,12	0,2276154

**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 11.** Concentración de glucosa en el experimento 1 del biorreactor spinner de 250 mL.



**Fuente:** elaboración propia.

Al comparar los resultados obtenidos, se puede evidenciar que, en el primer experimento ilustrado en la **gráfica 11**, el cual se le consideró exitoso, se tuvo un mayor consumo de glucosa, llegando a una concentración mínima de 0,046 g/L en el último punto (132 h). Teniendo esto en cuenta, la concentración celular en el

experimento 1 en ese mismo punto es considerablemente alto. Esto se debe a que la glucosa favorece el crecimiento de las células tumorales en cultivo, en donde si no se tuvieran en un medio con glucosa, morirían.

En el experimento 2 se evidencia una diferencia significativa de concentración de glucosa con respecto al experimento 1, ya que en el último punto de la **gráfica 9** (132 h) se llegó a una concentración mínima de 0,228 g/L y esto se ve reflejado en la cinética de crecimiento, debido a que las concentraciones celulares y la velocidad específica de crecimiento presentaron valores menores. Teniendo en cuenta lo anterior los resultados obtenidos en el experimento 2 no son los más ideales para trabajar.

### 3.5 SIMULACION DE UN BIORREACTOR

Para la simulación de los datos obtenidos en el biorreactor para el crecimiento de la línea celular REH, se considera el balance en un reactor intermitente de tanque agitado también conocido como reactor batch, este reactor es usado a menudo en investigaciones cinéticas dentro del laboratorio. Este es cargado mediante dos orificios de la parte superior del tanque, ningún compuesto ingresa o sale de este hasta que la reacción culmine, por lo tanto, los balances de materia que describen el comportamiento de las células y el sustrato dentro del biorreactor<sup>92</sup> quedarían expresados como:

Para la generación de células se tiene:

**Ecuación 6.** Velocidad de generación de las células.

$$\frac{dC_x}{dt} = r_x$$

**Fuente:** ERTOLA, Rodolfo; YANTORNO, Osvaldo y MIGNONE, Carlos. Sistemas de cultivo y aspectos generales de biorreactores. En: Microbiología Industrial. Washington, D.C.: 1994. p. 67. ISBN 9879508106

No se considera la tasa de muerte celular.

Para el consumo de sustrato

---

<sup>92</sup> SLIDECHARE. [sitio web]. ¿Qué es un Reactor Químico? [Consulta: 30 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/magnusgabrielhuertafernandez/tipos-de-reactores-51745874>

**Ecuación 7.** Velocidad de consumo de sustrato.

$$-\frac{dC_s}{dt} = r_s$$

**Fuente:** ERTOLA, Rodolfo; YANTORNO, Osvaldo y MIGNONE, Carlos. Sistemas de cultivo y aspectos generales de biorreactores. En: Microbiología Industrial. Washington, D.C.: 1994. p. 67. ISBN 9879508106

La evaluación de la cinética de crecimiento de células animales, microbiales o vegetales constituyen un aspecto fundamental en el diseño de operación, simulación y predicción del comportamiento de los reactores biológicos<sup>93</sup> por esta razón se evaluaron diferentes métodos que simularan el comportamiento de las células REH y se escogió el método que mejor se ajustara a los datos obtenidos experimentalmente en el biorreactor spinner de 250 mL.

**3.5.1 Parámetros cinéticos para el crecimiento de células.** Hay muchas leyes para la velocidad de crecimiento celular, sin embargo, la expresión más usada es la ecuación de Monod para crecimiento exponencial, dado que es uno de los modelos empleados con mayor frecuencia para relacionar el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad específica de formación de biomasa<sup>94</sup>.

Además de la ecuación de Monod, existen otras dos ecuaciones que se utilizan comúnmente para describir la velocidad de crecimiento celular, dichas ecuaciones son la de Tessier y la ecuación de Moser<sup>95</sup>, dado esto y según los datos obtenidos experimentalmente después de ser tratados, se utilizó la ecuación de Monod para representar la simulación debido a que las dos ecuaciones nombradas anteriormente no se ajustaban a los datos experimentales y presentaban errores más altos.

**Ecuación 8.** Ecuación de Monod.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{K_s + C_s}$$

**Fuente:** FOGLER, Scott H. Cinética de reacciones no elementales. En: Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas. 3 ed. México: Pearson Educación, 2001. p. 396. ISBN 970-26-0079-0

<sup>93</sup> DUARTE TORRES, Alberto. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. En: INGENIERIA E INVESTIGACIÓN. [Sitio web]. [Consultado 2 septiembre 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/ingevinv/article/view/20908/21816>

<sup>94</sup> Ibid., p. 123.

<sup>95</sup> FOGLER, Scott H. Cinética de reacciones no elementales. En: Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas. 3 ed. México: Pearson Educación, 2001. p. 397. ISBN 970-26-0079-0

Siendo

$\mu$  : Velocidad específica de crecimiento

$\mu_{\max}$  : Velocidad específica de crecimiento máxima

$C_X$  : Concentración de células

$C_S = s$  : Concentración del sustrato

$K_S$  : Constante de Monod o de saturación

Por lo general, al principio del cultivo batch, todos los nutrientes están en exceso, aún el sustrato limitante entonces cuando  $s \gg K_S$ , la constante de Monod puede ser ignorada y entonces  $s$  se cancela entre sí, la tasa de crecimiento específico  $\mu_{\max}$  y la tasa de crecimiento se vuelve independiente de  $s$  y es proporcional a la concentración por lo tanto para la fase exponencial, la ecuación anterior se reduce a:

**Ecuación 9.** Ecuación de Monod reducida.

$$r_x = \mu_{\max} \cdot C_X$$

**Fuente:** ERTOLA, Rodolfo; YANTORNO, Osvaldo y MIGNONE, Carlos. Sistemas de cultivo y aspectos generales de biorreactores. En: Microbiología Industrial. Washington, D.C.: 1994. p. 68. ISBN 9879508106

Esto se comprueba encontrando los valores de los parámetros de la cinética de Monod,  $\mu_{\max}$  y  $K_S$ , a partir de las relaciones lineales deducidas de la ecuación de Monod, tales como lineweaver- Burk, Eadie- Hofstee y Langmuir.

Para este caso se usa la linealización de Langmuir, la cual es:

**Ecuación 10.** Linealización de Langmuir.

$$\frac{s}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} + \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot s$$

**Fuente:** RAMIREZ REIVICH, Octavio T. Ingeniería Bioquímica. En: BOLIVAR ZAPATA, FRANCISCO G., ed. *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. 2 ed. México: 2007. p. 268. ISBN 978-970-640-352-0.

La representación gráfica de  $s/\mu$  vs  $s$  corresponde a una línea recta, cuyo intercepto es  $K_S/\mu_{\max}$  y cuya pendiente es  $1/\mu_{\max}$ .

Primero, de la ecuación de concentración celular del balance obtenida anteriormente en la **Gráfica 8** del experimento 1 del biorreactor spinner de 250 mL se tiene que:

$$x = 141376e^{0,0203 \cdot t}$$

Derivando la ecuación anterior con respecto al tiempo es posible obtener una ecuación que me relaciona el cambio de la biomasa con el tiempo, entonces:

**Ecuación 11.** Ecuación derivada.

$$\frac{dC_x}{dt} = 2869,93 * e^{0,0203 \cdot t}$$

**Fuente:** elaboración Propia

En la **tabla 14** se presentan los datos de formación de biomasa y el consumo de sustrato para el crecimiento de células REH en un reactor por lotes y el tratamiento correspondiente para encontrar los parámetros de la ecuación de Monod. Además, en la **gráfica 12** se muestra el ajuste de los datos usando la linealización de Langmuir.

**Tabla 14.** Evaluación de las velocidades de crecimiento de biomasa a partir de los datos de formación de biomasa y consumo de sustrato.

A	B	C	D	E	F
Tiempo (h)	C <sub>x</sub> (células/ml)	C <sub>s</sub> (mg/ml)	dC <sub>x</sub> /dt (células/ml-h)	μ (h <sup>-1</sup> )	s/μ (mg/ml-h)
0	163243	0,46479	2869,933	0,0176	26,438
12	173928	0,42618	3661,558	0,0211	20,244
24	193947	0,38022	4671,539	0,0241	15,785
36	285013	0,37470	5960,108	0,0209	17,918
48	388573	0,38573	7604,108	0,0196	19,711
60	523975	0,35264	9701,579	0,0185	19,046
72	558721	0,35264	12377,603	0,0222	15,918
84	678852	0,27542	15791,765	0,0233	11,840
96	909503	0,21475	20147,669	0,0222	9,694
108	1570288	0,15775	25705,079	0,0164	9,637
120	1803493	0,07134	32795,412	0,0182	3,923
132	2260720	0,04560	41841,498	0,0185	2,464

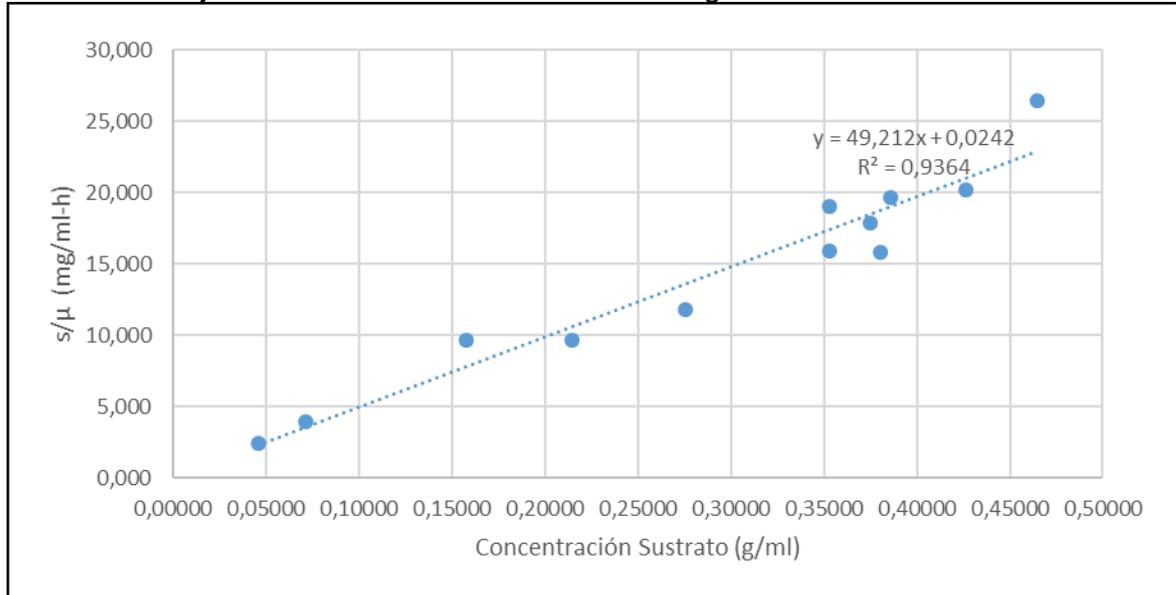
**Fuente:** elaboración propia.

Considerando la **tabla 14**, entonces:

- Columnas A, B, C: Datos de tiempo de cultivo, crecimiento de las células y consumo de sustrato respectivamente, obtenidos en un biorreactor de 250 mL.
- Columna D: Velocidad de crecimiento de células obtenidas con la ecuación 11.
- Columna E: Velocidad específica de crecimiento de biomasa, calculada con los valores de la columna B y la columna D.

- Columna F: Relación del sustrato con la velocidad específica de crecimiento  $s/\mu$  calculada con la columna C y la columna E.

**Gráfica 12.** Ajuste usando la linealización de Langmuir.



**Fuente:** elaboración propia.

De la ecuación lineal obtenida del ajuste mostrado en la **gráfica 12** se obtiene entonces:

$$\begin{aligned} \text{Pendiente} &= 49,212 = 1/\mu_{\max} \\ \text{Intercepto} &= 0,0242 = K_s/\mu_{\max} \end{aligned}$$

Por lo tanto:

$$\begin{aligned} \mu_{\max} &= 0,0203 \text{ h}^{-1} \\ K_s &= 4,9e - 4 \text{ g/mL} \end{aligned}$$

De acuerdo a los resultados obtenidos de la linealización de la ecuación de Monod, se comprueba que  $K_s$  es bastante pequeña, por lo tanto, se puede despreciar, entonces, la velocidad de generación de células se puede expresar como la **ecuación 9**:

$$r_x = 0,0203 \cdot C_x$$

**3.5.2 Parámetros cinéticos para el sustrato.** Ahora, para el consumo de sustrato se tiene que considerar primero:

$$\left[ \begin{array}{c} \text{Tasa neta de} \\ \text{consumo de} \\ \text{sustrato} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{c} \text{Velocidad a la que} \\ \text{es consumido por} \\ \text{las células} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Velocidad a la que} \\ \text{es consumido para} \\ \text{formar producto} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Velocidad a la que} \\ \text{es consumido para} \\ \text{mantenimiento} \end{array} \right]$$

Como no se considera la formación de producto y el consumo para mantenimiento, entonces:

**Ecuación 12.** Velocidad de consumo de sustrato.

$$r_s = Y_{sc}(-r_x)$$

**Fuente:** BARBA, Juan Antonio y C. CLAUSELL, Terol. Reactores bioquímicos. Fermentadores. En: Reactores químicos y bioquímicos. 1 ed. 2014. ISBN 978-84-695-9787-3

Donde  $Y_{sc}$  es el coeficiente de rendimiento y se puede escribir como:

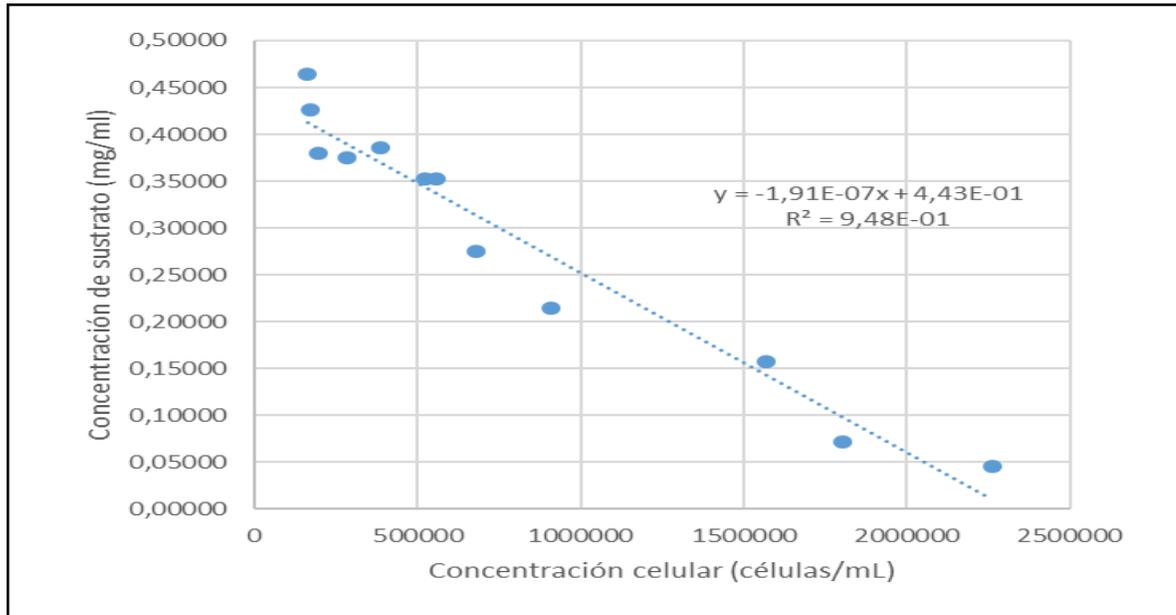
$$Y_{sc} = \frac{\text{Masa de sustrato consumido para formar nuevas células}}{\text{Masa de nuevas células formadas}} = \frac{-\Delta C_s}{\Delta C_x}$$

**3.5.2.1 Cálculo de la tasa de rendimiento de sustrato/biomasa.** Considerando la definición del coeficiente de rendimiento sustrato/biomasa, entonces:

$$Y_{sc} = \frac{-(C_s - C_{s_0})}{(C_x - C_{x_0})} = -\frac{dC_s}{dC_x}$$

De acuerdo a esto, el rendimiento se puede calcular a partir de la pendiente obtenida a partir de la graficar  $-(C_s - C_{s_0})$  vs  $(C_x - C_{x_0})$  o para este caso se obtuvo a partir de la gráfica de  $C_s$  vs  $C_x$  donde se obtuvo la siguiente gráfica:

**Gráfica 13.** Concentración de sustrato vs Concentración de células para el cálculo del coeficiente rendimiento sustrato/biomasa.



**Fuente:** elaboración propia.

De acuerdo a la **gráfica 13**, se obtuvo la siguiente ecuación

$$C_s = -1,91e - 7 \cdot C_x + 0,443$$

Ahora, derivando la concentración de sustrato con respecto a la concentración se tiene:

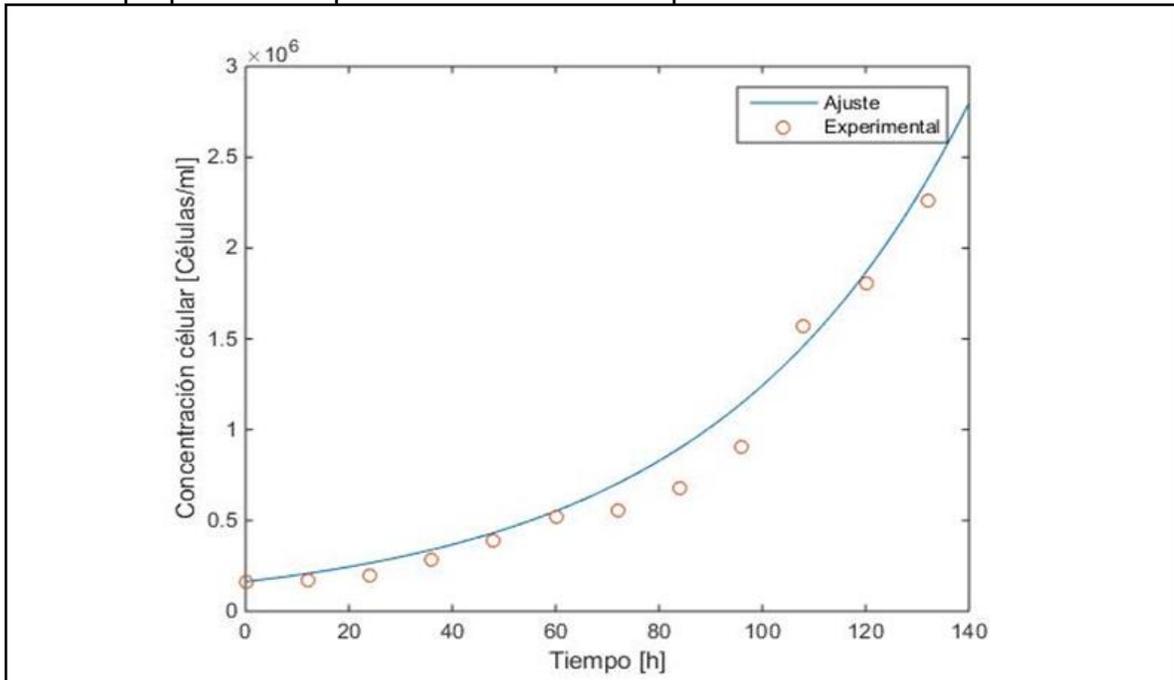
$$\frac{dC_s}{dC_x} == -1,91e - 7$$

Por lo tanto, el rendimiento sustrato/biomasa es

$$Y_{sc} = 1,91 e - 7 \frac{mg \text{ de azucar consumido}}{\text{número de células formadas}}$$

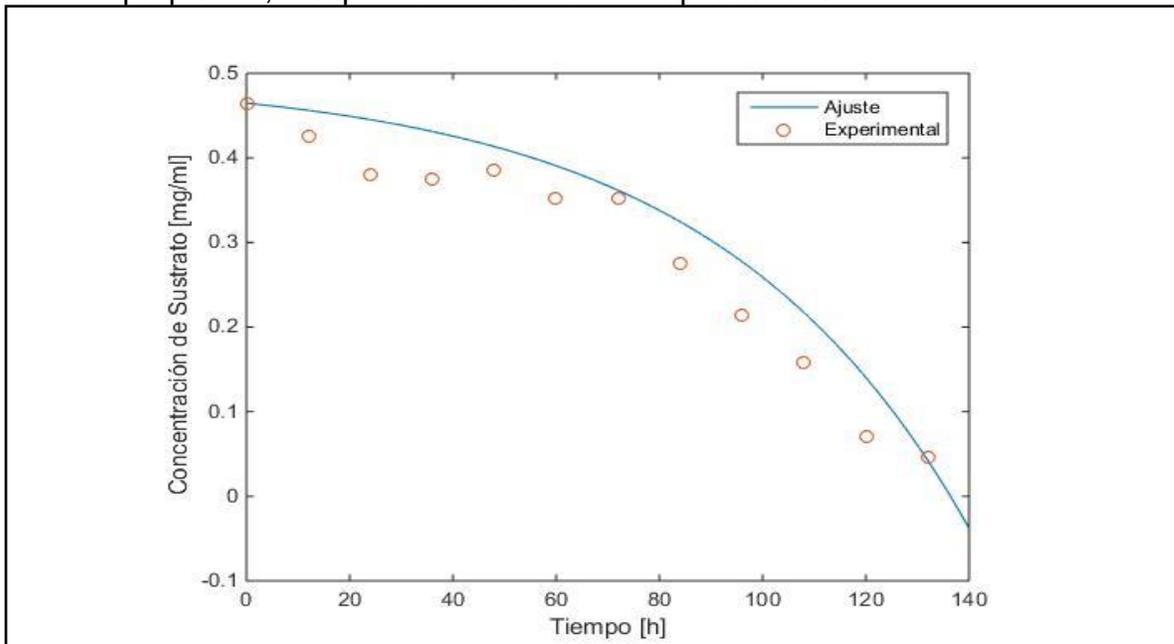
**3.5.3 Simulación en MATLAB de un biorreactor.** Retomando lo anterior, se usó el programa de código abierto, MATLAB, para la simulación de los perfiles de la biomasa y el sustrato dentro del biorreactor. Los balances considerados fueron las **ecuaciones (6) y (7)**, con sus respectivos parámetros. De acuerdo a esto se obtuvieron las **gráficas 14 y 15** respectivamente.

**Gráfica 14.** Comportamiento de las células en el biorreactor obtenida del modelo cinético propuesto comparado con los datos experimentales.



Fuente: elaboración propia

**Gráfica 15.** Comportamiento del sustrato en el biorreactor obtenida del modelo cinético propuesto, comparado con los datos experimentales.



Fuente: elaboración propia.

Como primer análisis, se aprecia que el comportamiento del crecimiento celular, el modelo cinético propuesto para la generación de células con el tiempo se ajusta en ciertos puntos a los datos experimentales, estos se analizan de mejor forma a partir de los errores relativos en estos puntos, por lo tanto, en la siguiente tabla se muestran el error en estos valores, de acuerdo a esto se aprecian errores hasta del 25% en ciertos puntos.

**Tabla 15.** Comparación de los datos experimentales y los datos obtenidos del modelo para el crecimiento celular.

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Experimental</u>	<u>Modelo</u>	<u>%error</u>
0	163243	163243	0,00
12	173928	208243	16,48
24	193947	265643	26,99
36	285013	338866	15,89
48	388573	432272	10,11
60	523975	551425	4,98
72	558721	703420	20,57
84	678852	897303	24,35
96	909503	1144615	20,54
108	1570288	1460090	-7,55
120	1803493	1862524	3,17
132	2260720	2376138	4,86

**Fuente:** elaboración propia.

Para el consumo de sustrato en el biorreactor se realizó el mismo tratamiento y se obtuvo el siguiente cuadro. En este caso, se obtuvieron errores más apreciables en comparación con el crecimiento celular.

**Tabla 16.** Comparación de los datos experimentales y los datos obtenidos del modelo para el consumo de sustrato.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Experimental</b>	<b>Modelo</b>	<b>%error</b>
0	0,46479	0,46479	0,00
12	0,4262	0,4562	6,58
24	0,3802	0,4452	14,60
36	0,3747	0,4312	13,11
48	0,3857	0,4134	6,69
60	0,3526	0,3906	9,73
72	0,3526	0,3616	2,48
84	0,2754	0,3246	15,15
96	0,2147	0,2773	22,57
108	0,1577	0,2171	27,34
120	0,0713	0,1402	49,13
132	0,0456	0,0421	-8,24

**Fuente:** elaboración propia.

En general, tanto para el crecimiento celular como para el consumo de sustrato dentro del biorreactor tienden a tener comportamientos similares a los datos experimentales, pero no hay que ignorar que hay diferencias significativas en ciertos puntos, esto puede deberse a diversos factores ya sea en la toma de datos o en el ajuste de datos, ya que, en todos los casos, el ajuste de parámetros se trabajó con coeficientes  $R^2$  entre 0,92-0,95, por lo que indica desviaciones en los ajustes.

#### 4. CONCLUSIONES

- El objetivo principal de este proyecto que consistía en evaluar la producción de células de leucemia linfocítica aguda (REH) en un biorreactor spinner de 250 mililitros se cumplió satisfactoriamente, ya que crecieron masivamente, obteniendo productividades altas al finalizar los experimentos.
- Se establecieron las cinéticas de crecimiento de los ensayos con microplaca y en cajas de Petri respectivamente y se evidenció que el tiempo de duplicación en las cajas de Petri disminuyó considerablemente (35,79 h) en comparación con los cultivos en microplaca (63,06 h) por lo que se lograron concentraciones altas, esto se debe a que en el cultivo en microplaca no hubo una interacción celular suficiente, esto se ve reflejado en las bajas productividades presentadas.
- Los datos obtenidos durante el desarrollo de este proyecto permitieron generar un modelo patrón del cultivo de células REH para futuros estudios, con el fin de estimar tiempos y fechas para la obtención de concentraciones celulares esperadas.
- A partir del ensayo en el biorreactor spinner de 250 mL se evidenció que condiciones ya establecidas eran las apropiadas para el crecimiento de células REH, estas condiciones fueron: Temperatura de 38°C, 5% CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa. Además, se determinó que la velocidad de agitación óptima para el crecimiento de las células REH se encuentra en un rango entre 65 y 80 rpm, donde el esfuerzo cortante no afecta el crecimiento.
- Se evidenció que el consumo de glucosa favorece la productividad celular en el biorreactor spinner de 250 mL, puesto que en el punto de mayor consumo de glucosa se encuentra la mayor concentración celular obtenida en los ensayos realizados.

## 5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar la productividad de las células REH en escalas mayores, con el fin de determinar las variables que pueden afectar su crecimiento.
- Se recomienda realizar el crecimiento de células en el biorreactor hasta la fase estacionaria para obtener un modelo cinético que describa todo el proceso de crecimiento y de esta forma, los datos sean fácilmente reproducibles.
- Se recomienda realizar varios ensayos de laboratorio para el crecimiento de las células REH en el biorreactor spinner de 250 mL, para tener más puntos de comparación y poder realizar un análisis estadístico para su tratamiento y así obtener datos más precisos, ya que la modelación se realizó con sólo un ensayo, lo que genera incertidumbre debido a la magnitud de los datos.
- Para alcanzar la misma o una mejor productividad de la obtenida en el biorreactor de 250 mL, se recomienda medir la transferencia de oxígeno dentro del biorreactor, y así ajustar los parámetros mencionados para un trabajar en un volumen mayor, con el fin de que las células estén bajo las mismas condiciones de aireación y agitación y así su productividad se mantenga.
- En caso de continuar con la metodología aquí presentada, se recomienda cuantificar la producción de lactato y evaluar la relación que tiene con el consumo de glucosa a la hora de la producción de estas células.

## BIBLIOGRAFIA

ACUÑA, R. Adimensionamiento y escalamiento de bioprocesos. [sitio web]. [consultado el 5 noviembre 2018, 12:28]. Disponible en: <https://bioreactorcrc.wordpress.com/2008/08/14/adimensionamiento-y-escalamiento-de-bioprosesos/>

ANALISIS DE ALIMENTOS. [sitio web]. Método de DNS. [Consulta: 14 diciembre 2018]. Disponible en: <http://metodosdeanalisisdealimentos.blogspot.com/2018/04/proposito-elmetodo-dns-acido.html>

ANAYA DURAND, Alejandro y PEDROZA FLORES, Humberto. Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. En: TECNOLOGÍA, CIENCIA, EDUCACIÓN. [sitio web]. México D.F. [Consulta 2 septiembre 2017]. Archivo pdf. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48223105>. vol. 23, pp. 31-39.

ARREDONDO VEGA, Bertha O. y VOLTOLINA, Domenico. Concentración, Recuento Celular y Tasa de Crecimiento. En: MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL. [sitio web]. [Consulta 25 enero 2017]. Capítulo 2. 22p. Archivo en pdf. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/253237563\\_CONCENTRACION\\_RECUE NTO\\_CELULAR\\_Y\\_TASA\\_DE\\_CRECIMIENTO](https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUE NTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO)

BARBA, Juan Antonio y C. CLAUSELL, Terol. Reactores bioquímicos. Fermentadores. En: Reactores químicos y bioquímicos. 1 ed. 2014. ISBN 978-84-695-9787-3

CAMPILLO, Santiago. Viroterapia, otra herramienta contra el cáncer. En: HELPING CÁNCER. [sitio web]. [Consulta 19 mayo 2018]. Disponible en: <https://www.helpingcancer.tv/viroterapia-otra-herramienta-contra-el-cancer/> CANCERQUEST. [sitio web]. El Sistema Inmunológico. [Consulta: 29 noviembre 2018]. Disponible en: <https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/el-sistema-inmune>

CÁRDENAS BELTRÁN, Nathaly. Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas). [en línea]. Trabajo de grado (Microbióloga Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, 2013. [Consultado 10 septiembre 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11818/CardenasBeltranNathaly2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

CASADIEGOS RINCON, Sergio Alexander. Evaluación de la transferencia de CO<sub>2</sub> al medio de cultivo en un biorreactor tipo spinner para el cultivo de fibroplastos. [en

línea]. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, 2011. [Consultado 20 febrero 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/4018/1/192523.2011.pdf>

CORNING. [sitio web]. 250 mL Corning ProCulture Glass Spinner Flask with 70 mm Flat Center Cap and 2 Angled Sidearms. [Consulta: 20 enero 2019]. Disponible en: <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2b/MX/en/Cell-Culture/Cell-Culture-Vessels/Flasks,-Culture/Corning®-ProCulture-Glass-Spinner-Flask-with-Angled-Sidearms/p/4500-250>

COSSIO BAYÚGAR, Raquel, et al. Tipos de cultivo celular. En: Cultivo in vitro de células animales y sus aplicaciones. 3 ed. México: Grupo Garlong Impresores, SA. De C.V., 2011. p. 1-184.

ECURED. [sitio web]. Cultivo Celular. [Consulta: 6 agosto 2017, 10:25]. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Cultivo\\_Celular](https://www.ecured.cu/Cultivo_Celular)

Cultivos Celulares, Elemento Fundamental para la Investigación, Líneas Celulares. [sitio web] En: REVISTA ACOVEZ. vol. 24, no. 1. [Consulta: 23 agosto 2018]. Disponible en: [https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24\\_desarrollos16/](https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24_desarrollos16/)

DORAN, Pauline. Bioprocess engineering principles. 2 ed. Oxford: Academic Press, 2012. 417 p. ISBN 978-0-12-220851-5

DUARTE TORRES, Alberto. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. En: INGENIERIA E INVESTIGACIÓN. [Sitio web]. [Consultado 2 septiembre 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/ingein/article/view/20908/21816>

DURANGO LONDOÑO, Laura Patricia. Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *Saccharomyces spp.* A nivel laboratorio. [en línea]. Tesis de pregrado. Universidad EAFIT, 2007. p.48. Disponible en: [https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/399/LauraPatricia\\_DurangoLondo%F1o\\_2007.pdf?sequence=1](https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/399/LauraPatricia_DurangoLondo%F1o_2007.pdf?sequence=1)

ERTOLA, Rodolfo; YANTORNO, Osvaldo y MIGNONE, Carlos. Sistemas de cultivo y aspectos generales de biorreactores. En: Microbiología Industrial. Washington, D.C.: 1994. p. 60-70. ISBN 9879508106

FOGLER, Scott H. Cinética de reacciones no elementales. En: Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas. 3 ed. México: Pearson Educación, 2001. p. 397. ISBN 970-26-0079-0

FRAHM, Björn, et al. Determination of dissolved CO<sub>2</sub> concentration and CO<sub>2</sub> production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement. En: JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. [sitio web]. Vol. 99, nro. 2, pp. 133-148. Archivo pdf. [Consultado 12 junio 2018]. DOI: //doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00180-3

FRESHNEY, Robert Ian. Introduction. En: Culture of animals cells A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE. 4 ed. New York: John Wiley, 2005. p. 4-37.

FUNDACIÓN PARA LA EXCELENCIA Y LA CALIDAD DE LA ONCOLOGÍA. [sitio web]. ECO, Generalidades en Oncología. [Consulta: 26 julio 2018]. Disponible en: <https://www.fundacioneco.es/wp-content/uploads/2014/04/1.Generalidades.pdf>

GIÁCOMAN VALLEJOS, Gérman, et al. Análisis de la hidrodinámica de un reactor de flijo piston. *Revista Académica, Universidad Autónoma de Yucatán*. 2003, Vol. 7, nro. 003, pp. 7-19. ISSN 1665-529X

HERRRERO FERNANDEZ, Beatriz. VIRUS: ¿NUEVA HERRAMIENTA TERAPÉUTICA CONTRA EL CÁNCER? [sitio web]. [Consulta: 29 diciembre 2018]. Disponible en: <https://biotecnologia.fundaciontelefonica.com/2016/10/12/virus-nueva-herramienta-terapeutica-contra-el-cancer/>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC-1486-6166. Bogotá D.C.: El instituto, 2018. ISBN 9789588585673

LEVENSPIEL, Octave. Ingeniería de las reacciones químicas. 2 ed. México D.F.: Ediciones Repla, S.A., 1987. 276 p. ISBN 968-6165-03-7

LIFEDER.COM. [sitio web]. Azúcares reductores: Métodos para determinación, Importancia. [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/azucars-reductores/>

LOZANO ROMERO, E; GODOY SILVA, E. y GUERRERO, Carlos A. (52h) Scale-up of the Production of Rotavirus on Sp2/0-Ag14 Cell Culture up to 2L Bioreactor. [En línea]. En: AIChE Annual Meeting (Atlanta, Estados Unidos) Atlanta.2014. párr. 2. [Consultado: 19 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.aische.org/conferences/aische-annual-meeting/2014/proceeding/paper/52h-scale-production-rotavirus-on-sp20-ag14-cell-culture-2l-bioreactor-1>

MACKENZIE, Cosmo G.; MACKENZIE, Julia B. Y BECK, Paul. The effect of pH on growth, protein synthesis, and lipid-rich particles of cultured mammalian cells. En: THE JOURNAL OF BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL CYTOLOGY. [sitio web].

Vol. 9, p. 141-156. Archivo pdf. [Consultado 12 junio 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13764902>

MARTÍN BAUTISTA, Liliana. Análisis de la unión del rotavirus a los glóbulos rojos y el efecto que tiene dicha unión en la capacidad infecciosa en líneas tumorales. Tesis de magíster en ciencias, microbiología. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. 2015; p. 1 – 87.

MARTIN, Ivan; WENDT, David y HEBERER, Michael. The role of bioreactors in tissue engineering. En: TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. [sitio web]. Vol. 22, nro. 2, pp. 80-86. Archivo pdf. [Consultado 12 junio 2018]. DOI: [//doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001)

MARTINEZ SALAZAR, Verónica Sofía. Optimización del cultivo de células HEK293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus. [en línea]. Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas, 2007. [Consultado 13 enero 2019]. p. 1-113.

MILLER, William M., et al. *Environmental effects on cell physiology and metabolism: Response to elevated pCO<sub>2</sub>*. En: Lindner-Olsson E., Chatzissavidou N., Lüllau E., eds. ANIMAL CELL TECHNOLOGY. 2001 pp. 121-128. ISBN 978-94-010-3897-3.

MORGAN, Sara J.; DARLING, David C. Cultivo de células animales. Traducido por Jesús García Sánchez. Zaragoza: Acribia, D.L., 1995. 159 p. ISBN 978-842-0007-77-9

NAJAFPOUR, Ghasem D. Bioprocess Scale Up. En: Biochemical Engineering and Biotechnology. 2 ed. 2015. p. 375-416.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. [Sitio web]. OMS. [consulta: 26 de julio de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

PAPOUTSAKIS, Eleftherios T. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. En: TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. [sitio web], Vol. 9, nro. 1, pp. 427-437. Archivo pdf. [Consultado: 25 agosto 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0167779991901458>

PATHI, Pragyansri; MA, Teng y LOCKE, Bruce R.. Role of nutrient supply on cell growth in bioreactor design for tissue engineering of hematopoietic cells. En: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. [sitio web]. Marzo 2005, vol. 89, nro. 7, pp. 743-758. Archivo pdf. [Consultado 23 junio 2018]. DOI 10.1002/bit.20367

PÖRTNER, Ralf, et al. Bioreactor design for tissue engineering. En: JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING. [sitio web]. Vol. 100, nro. 3, p. 235-245. Archivo pdf. [Consultado 12 junio 2018]. DOI: [//doi.org/10.1263/jbb.100.235](https://doi.org/10.1263/jbb.100.235)

RAMIREZ REIVICH, Octavio T. Ingeniería Bioquímica. En: BOLIVAR ZAPATA, FRANCISCO G., ed. *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. 2 ed. México: 2007. pp. 249-296. ISBN 978-970-640-352-0.

RUIZ COLORADO, Angela Adriana. Factores para la producción biotecnológica de etanol carburante. [en línea]. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, 2009. [Consultado 5 noviembre 2018]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/10291/1/43674021.2009.pdf>

SCRIBD. [sitio web]. Determinacion de Azucares Reductores Por El Metodo Del DNS. [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/338160367/Determinacion-de-Azucars-Reductores-Por-El-Metodo-Del-DNS>

SCRIBD. [sitio web]. Metodo DNS. [ Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/349092123/Metodo-DNS>

SLIDESHARE. [sitio web]. Determinación de azúcares reductores por espectrofotometría (Método DNS). [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/vegabner/determinacin-de-azcares-reductores-por-espectrofotometra-mtodo-dns>

SLIDECHARE. [sitio web]. ¿Qué es un Reactor Químico? [Consulta: 30 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/magnusgabrielhuertafernandez/tipos-de-reactores-51745874>

SLIDESHARE. [sitio web]. Técnicas de tinción más utilizadas en el campo de la histología. [Consulta: 30 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/medicinac/tcnicas-de-tincin>

SPECTOR, Myron. Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. En: SWISS MEDICAL WEEKLY. [sitio web]. [Consulta 16 junio 2017]. Archivo pdf. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/e81a/ce3040354cc46df05bbaeb7b6108c02ee55e.pdf> . vol. 136, p. 293-301.

SZE, Daniel Y, REID, Tony R y ROSE, Steven C. Oncolytic Virotherapy. En: JOURNAL OF VASCULAR AND INTERVENTIONAL RADIOLOGY. [Sitio web]. [Consulta 12 junio 2018]. Archivo pdf. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1051044313010245?via%3Dihub>

TAVIRA MONTALVAN, Carlos Alberto, et al. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. En: REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS. [sitio web]. México: [Consulta 5 noviembre 2017]. Archivo pdf. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912962006> Vol.; 40. No 4; p. 35-46.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. [sitio web]. RPMI 1640 Medium. [Consulta: 24 septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11875093>

TOLOSA, Amparo. Un virus modificado, nueva arma contra el cáncer. En: GENÉTICA MÉDICA NEWS. Vol 2. No 25 (may 2015); p. 1-37.

WONG, Han Hsi; LEMOINE, Nicholas R. y WANG, Yaohe. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. En: Viruses. DOI 10.3390/v2010078. Vol.; 2 (2010); p. 78-106.

# ANEXOS

## ANEXO A

### PROTOCOLO 1: OBTENCIÓN DE AZUL DE TRIPANO

#### Reactivos y Materiales

- Azul de tripan
- Azida
- PBS (Phosphate Buffered Salin)

#### Procedimiento

Tomar 0,025 gramos de azul de tripan.

Tomar 0.002 gramos de azida.

Pesar las cantidades exactas y verterlas en un tubo de falcón de 50 mL.

Llevar a la cabina de flujo laminar y mezclar lo anterior con 10 mL de PBS ya que este se encuentra estéril.

Centrifugar a 1200 rpm, o 320 X g, por 5 a 10 minutos.

Llevar a la cabina de flujo laminar y filtrar.

## ANEXO B

### PROTOCOLO 2: CONTEO CELULAR POR MEDIO DE CÁMARA DE NEUBAUER

#### Reactivos y Materiales

- Azul de tripano
- Medio de cultivo
- Microscopio
- Micropipeta
- Cámara de Neubauer

#### Procedimiento

- Tomar 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células y colocarla en una lámina de vidrio
- Tomar 10  $\mu\text{L}$  de azul de tripano y mezclarlo con la muestra que anteriormente se puso en la lámina de vidrio.
- Limpie la superficie de la cámara de Neubauer con alcohol al 70% con un paño suave.
- Deje evaporar el alcohol en el ambiente.
- Colocar el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer.
- Con una micropipeta tomar la muestra preparada en la lámina de vidrio y colocarla en la cámara de Neubauer de tal manera que se distribuyan en la cámara por capilaridad.
- Ubicar en microscopio invertido en el objetivo 10X la cámara de Neubauer.
- Realizar conteo celular en una de las zonas marcadas (L). Se cuentan las células en la cámara de Neubauer, las células que estén teñidas de azul no se cuentan porque están muertas, ya que el azul de tripano, es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues, las células que aparecen de color azul, son consideradas no viables, y estas no se cuentan.
- Calcular las células/mL que tenemos con la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ de células en los 4 cuadrantes}}{4} \times 2 \times 10000 = \text{Total de células viables} \left( \frac{\text{cells}}{\text{ml}} \right)$$

## ANEXO C

### PROTOCOLO 3: CAMBIO DE MEDIO

#### Reactivos y Materiales

- Medio de Cultivo
- Suero Fetal Bovino
- Micropipeta
- Tubo falcon
- Cultivo Celular

#### Procedimiento

- Poner en condiciones adecuadas (cabina de flujo laminar) medio de cultivo, suero fetal bovino, cultivo celular y materiales que se van a utilizar.
- Pasar todo el contenido de la caja de Petri con una micropipeta a un tubo falcon.
- Centrifugar a 1200 rpm, o 320 X g, por 5 minutos.
- Llevar a la cabina de flujo laminar y desechar adecuadamente el sobrenadante en un recipiente.
- Resuspender en medio de cultivo hasta homogenizar.
- Pasar las células del tubo falcon a una caja de Petri estéril y lista para utilizar.
- Agregar medio de cultivo faltante (si falta) y suplementar con suero fetal bovino al 10%.

## ANEXO D

### PROTOCOLO 4: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES MEDIANTE ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

#### Reactivos

- Solución DNS (A)

#### Preparación:

- A 700 mL de agua destilada adicionar 16 g de hidróxido de sodio, 300 g de tartrato de sodio y potasio y 10 g de ácido dinitrosalicílico (DNS). Agitar hasta disolver completamente y luego aforar a 1000 mL con agua destilada.
- Agua destilada
- Muestra del sobrenadante en caso de que la fuente de carbono sea un azúcar reductor como la glucosa o la fructosa o muestra del hidrolizado con invertasa (ver protocolo 5) si la fuente de carbono es sacarosa.

#### Procedimiento

1. Adicionar a un tubo de ensayo 150  $\mu$ L del sobrenadante o del hidrolizado, según el caso.
2. Adicionar 350  $\mu$ L de agua destilada.
3. Adicionar 500  $\mu$ L de reactivo DNS (Solución A).
4. Agitar con vortex para mezclar
5. Colocar en un vaso de precipitado con agua en ebullición durante 5 minutos, deben colocarse solo hasta que el agua ya se encuentre en ebullición, no antes; pasado este tiempo se debe observar un color que va desde amarillo hasta café, pasando por el naranja, de acuerdo con la concentración de azúcares reductores; a mayor concentración más oscuro será el color desarrollado por la muestra.
6. Pasar los tubos a un recipiente con hielo y un poco de agua.
7. Adicionar 5 mL de agua destilada a cada tubo.
8. Agitar y dejar en reposo durante 15 minutos.
9. Leer a 540 nm de absorbancia.

#### Preparación del blanco

El blanco es la solución contra la cual se comparan las muestras, es de color amarillo similar al de la solución de DNS (A) y para su preparación se adicionan 500  $\mu$ L de agua destilada a un tubo de ensayo y se siguen los pasos del 3 al 8. Es importante que el blanco se prepare al tiempo con las muestras para evitar fuentes de error adicionales.

## Curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se prepara una solución madre de glucosa de 2 g/L a partir de la cual se preparan en tubos de ensayo las soluciones descritas en la siguiente tabla:

	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solución madre de glucosa ( $\mu\text{L}$ )	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0
Volumen final ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Concentración (g/L)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2

Una vez se tienen las soluciones anteriores en los tubos de ensayo, se continúa con el procedimiento desde el paso 3 y se grafica la absorbancia contra la concentración de cada muestra. Se hace la regresión lineal correspondiente y se obtiene así la ecuación de absorbancia (y) en términos de la concentración (x).

**Nota 1:** Si se quiere conservar la solución madre de glucosa ésta se debe almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Nota 2:** El límite de detección de la técnica aquí descrita es 2 g/L, por lo tanto, debe procurarse que la muestra a leer se encuentre por debajo de este valor, de lo contrario será necesario hacer una dilución. Si lo que se quiere determinar es glucosa o fructosa directamente primero debe hacerse la dilución del sobrenadante y tomar 150 L de la dilución para continuar con el procedimiento desde el paso 1. Si por el contrario se emplea sacarosa, la dilución debe hacerse antes de llevar a cabo la hidrólisis con invertasa y se debe incluir también esta dilución.

Ejemplo:

Se sabe que la concentración inicial de sacarosa en el medio de cultivo es de 12 g/L, por lo tanto, es necesario diluirla por lo menos 6 veces para tener una muestra cuya concentración será aproximadamente de 2g/L. Se debe entonces diluir primero 3 veces empleando, por ejemplo, 300  $\mu\text{L}$  de sobrenadante + 600  $\mu\text{L}$  de agua destilada. De ésta última dilución se toman los 500  $\mu\text{L}$  que se mezclan con los 500  $\mu\text{L}$  de invertasa, donde se está diluyendo 2 veces más. Por lo tanto se tiene que la muestra se diluyó finalmente (3x2) 6 veces. A medida que el microorganismo consume la sacarosa el factor de dilución tendrá que ser menor y dependerá de que tan rápido se consume el sustrato y del periodo de muestreo. Para la sacarosa, siempre se va a tener el 2 como el mínimo factor de dilución ya que siempre es necesario hacer la hidrólisis con invertasa.

**Nota 3:** Desafortunadamente cuando se requiere determinar la concentración de azúcares reductores de una muestra altamente concentrada, por ejemplo, 30g/L, existe un error asociado a la dilución y la curva elaborada como se describió anteriormente no funciona. Para este caso se elaboró también una curva partiendo de una solución madre de 30g/L que fue diluida de 2 a 100 veces, es decir se obtuvieron varias diluciones en el rango de 15g/l a 0.3 g/L con las cuales se siguió el procedimiento desde el paso 1.

**Ecuaciones despejadas para los reactivos empleados actualmente:**

- Empleando una solución madre de 2g/L de glucosa:

$$\text{Concentración de glucosa (g/L)} = 1.9013 * \text{Absorbancia} + 0.0473$$

- Empleando una solución madre de 30g/L de sacarosa:

$$\text{Concentración de sacarosa (g/L)} = 10.21 * \text{Absorbancia} - 0.179$$

**Nota 4:** Cada vez que se prepare una nueva solución de DNS o de invertasa se deben elaborar nuevas curvas de calibración.