
INTRODUCCIÓ

CAPÍTOL 1

1. INTRODUCCIÓ: IMPORTÀNCIA I PROBLEMÀTIQUES DEL CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS

1.1. El cultiu de cèl·lules animals

La indústria farmacèutica se serveix de les cèl·lules animals per a la producció de compostos d'elevat interès econòmic, tot i les limitacions que imposen les restriccions en les condicions del seu cultiu en biorreactors, com són la baixa velocitat específica de creixement, els requeriments nutricionals complexos i la seva fragilitat en les condicions de cultiu (Arathoon i Birch, 1986; MacDonald, 1990; Hesse i Wagner, 2000). Així, l'aplicació més important recau en la producció de proteïnes d'interès terapèutic i diagnòstic, la funcionalitat de les quals depèn de les modificacions postraduccionals sofertes durant el procés de biosíntesi, que són exclusives de les cèl·lules animals i estan influenciades per les condicions de cultiu (Andersen i Goochee, 1994).

A la Taula 1.1, es presenten com a exemple alguns dels productes comercialitzats, d'on es destaca la producció d'anticossos monoclonals, dels quals es preveu augmentar el volum de vendes fins als 2000 milions d'euros en els propers dos anys. El volum d'anticossos monoclonals comercialitzats s'ha incrementat dels 257 kg el 1999 fins a una previsió de 558 kg pel 2002. El percentatge d'augment dels anticossos monoclonals s'incrementarà a un ritme anual del 20% (això es tradueix en 75-100 kg per any). A més a més, actualment hi ha 235 anticossos

monoclonals terapèutics en procés de desenvolupament dels quals es preveu que cap el 2010 se'n puguin comercialitzar 100.

En resposta a aquestes perspectives econòmiques, es fa necessària la construcció d'unes 25 noves plantes de producció que costaran a les empreses del sector uns 5-6 mil milions d'euros (Dutton, 2001). Un exemple n'és la de Vacaville, on Genentech ha invertit més de 250 milions d'euros, essent la planta multi-producte a partir del cultiu de cèl·lules animals més gran al món (www.gene.com).

PROTEÏNA	FUNCIÓ	VALOR COMERCIAL (en milions d'euros)
Anticossos monoclonals	Teràpia i diagnòstic	Teràpia, 125 (1994) Diagnòstic, 575 (1992)
t-PA	Agent fibrinolític	260 (1994)
EPO	Agent antianèmic	1430 (1994)
Factors VII, VIII, IX i X	Hemofília, agents coagulants	F VIII 235 (1992)
FSH, hCG	Tractament de la infertilitat	250 (1994)
IL-2	Anticancerigen, immunomodulador, tractament de l'HIV	20 (1992)
IFN- α	Anticancerigen, immunomodulador	565 (1992)
IFN- β	Anticancerigen, antiviral	20 (1992)
IFN- γ	Anticancerigen, Immunomodulador	25 (1992)
Factor estimulant de granulòcits	Anticancerigen	870 (1994)
Hormona del creixement humana	Tractament de l'enanisme	235 (1994)

Taula 1.1. Exemple de proteïnes produïdes per cèl·lules animals i d'aplicació farmacèutica, amb la seva funció i una estimació del valor comercialitzat. L'any d'estimació del valor comercial s'indica entre parèntesi, les dades provenen de Klausner, 1993; de Koning et al., 1994; Verbert, 1996; i Birch, 1997.

El potencial que ofereix l'ús a gran escala dels anticossos monoclonals en diagnòstic, terapèutica i processos de purificació, entre d'altres camps d'interès biotecnològic, ha portat a dirigir l'atenció a la millora de processos basats en el cultiu de les cèl·lules que els produeixen, els híbridomes.

1.2. Hibridomes: cèl·lules productores d'anticossos monoclonals

Els vertebrats produeixen una gran varietat d'anticossos, ja que l'exposició a un antigen (molècula aliena a l'organisme) estimula els limfòcits B del sistema immunològic per a la producció d'aquests (Peña, 1998). El conjunt d'anticossos produïts pels limfòcits B induïts en una resposta antigènica específica s'anomenen anticossos policlonals.

Cada limfòcit B activat constitueix un clon de cèl·lules productor d'un sol tipus d'anticòs que reconeix una regió concreta de l'antigen, aquest anticòs s'anomena anticòs monoclonal (Milstein, 1980). Aquesta capacitat dels anticossos monoclonals per a reconèixer específicament una regió d'un antigen (poden arribar a distingir entre proteïnes que difereixen tan sols en un únic aminoàcid) i la possibilitat de producció en grans quantitats en un cultiu d'un clon que produeixi l'anticòs d'interès en fa molt atractiu el seu ús en el camp de la teràpia i el diagnòstic (Yelton, 1981; Price, 1987; Waldmann, 1991). El cultiu dels limfòcits B presenta, però, greus inconvenients; en primer lloc, tendeixen a desdiferenciar-se i a perdre la seva capacitat productora d'anticòs; i, en segon lloc, no tenen la capacitat de reproduir-se indefinidament en cultius *in vitro*.

La fusió de limfòcits B amb línies tumorals de mieloma permet l'obtenció d'una línia immortal productora de l'anticòs que es pot cultivar *in vitro*. El tipus cel·lular obtingut s'anomena *hibridoma* i conserva característiques d'ambdues línies cel·lulars, la producció de l'anticòs específic del clon de limfòcit B utilitzat en la fusió i la capacitat de reproduir-se indefinidament sense desdiferenciar-se aportada per la línia tumoral de mieloma (Köhler i Milstein, 1975).

Aquests anticossos, però, són murins i pel seu ús en terapèutica es requereix la humanització de la proteïna. Actualment, enlloc d'humanitzar-los, l'empresa Abgenix ha desenvolupat la tecnologia per generar anticossos amb seqüències proteïques totalment humanes utilitzant soques de ratolins modificats genèticament en els quals l'expressió dels gens dels anticossos de ratolins han estat suprimits i funcionalment reemplaçats pels gens d'anticossos humans, deixant intacte la resta del sistema immunològic murí (www.abgenix.com).

En aquest treball, s'ha utilitzat com a model d'estudi la línia cel·lular d'hibridoma KB26.5, productora d'una immunoglobulina (IgG₃) dirigida contra l'antigen A₁ d'eritròcits (prèviament descrita per Sanfeliu, 1995).

1.3. El cultiu de cèl·lules d'hibridoma i la seva problemàtica

A la Figura 1.1, es mostra el seguiment de la viabilitat de cèl·lules d'hibridoma en un cultiu en discontinu. S'hi observen dues fases clarament diferenciades: una de creixement exponencial, la prolongació de la qual permet perllongar també el temps de vida del cultiu en el bioreactor i, així, augmentar la producció total. En aquest sentit, és possible fer les cèl·lules més eficients en les condicions de cultiu mitjançant la redistribució dels fluxos metabòlics per tècniques d'*enginyeria metabòlica* (Bailey, 1992; Paredes, 1998; Vives, 1999). No obstant això, en arribar a les 72 hores, s'assoleix la màxima densitat cel·lular i el cultiu entra en una fase on la viabilitat cel·lular disminueix dràsticament. Durant molts anys, la mort cel·lular dins els bioreactors ha estat considerada com un fenomen passiu i incontrolable, i s'havia assumit aquest procés com a fet accidental en resposta a un ambient agressiu dins del bioreactor. Avui dia, però, se sap que el principal mecanisme de mort en cèl·lules cultivades *in vitro* és controlat intrínsecament per les pròpies cèl·lules en resposta a modificacions concretes en el seu ambient. De fet, una gran fracció de les cèl·lules participa activament en la seva pròpia mort en un procés conegut com mort cel·lular programada (PCD) o apoptosi (Singh et al., 1994).

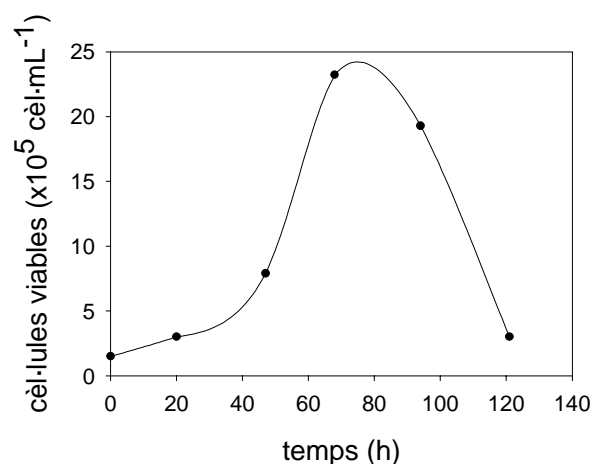


Figura 1.1. Perfil típic de creixement de cèl·lules d'hibridoma KB26.5 en un cultiu en discontinu. L'evolució de la concentració de cèl·lules viables respecte el temps durant les primeres 72 h es caracteritza per una etapa de creixement exponencial. A partir d'aquest moment, el cultiu entra en una fase de mort.

Així doncs, la mort és un factor crític que limita la productivitat del cultiu de cèl·lules animals i augmenta els riscos de degradació dels productes sintetitzats (Mercille i Massie, 1994). Donada la seva importància en el rendiment del cultiu, en aquest treball s'ha dirigit l'atenció a la protecció de les cèl·lules respecte la fase de mort cel·lular del cultiu d'hibridomes. Aquest procés de mort es caracteritza per uns canvis morfològics en les cèl·lules fàcilment observables i molt ben establerts: reducció del volum cel·lular, formació de lòbuls a la membrana plasmàtica, condensació de la cromatina, fragmentació del nucli i, finalment, la desintegració de la cèl·lula en el que s'anomenen els cossos apoptòtics (McKenna et al., 1999). Aquestes característiques

reflecteixen un procés de desmantellament cel·lular intern perfectament ordenat. *In vivo*, les alteracions en la superfície de la membrana plasmàtica i la formació dels cossos apoptòtics permeten el reconeixement de la cèl·lula pels macròfags, que són els encarregats de fagocitar-la. A diferència de la necrosi, en la qual els components cel·lulars són alliberats, l'apoptosi no indueix resposta inflamatòria. *In vitro*, els cossos apoptòtics són lisats en un procés conegut com *necrosi secundària* (Figura 1.2).

Factors tant interns com externs influeixen en la supervivència de les cèl·lules. Així, mantenir el balanç correcte entre la vida i la mort requereix un alt grau de regulació. En condicions fisiològiques, l'activació o inhibició no apropiada de la PCD pot conduir des del desenvolupament de cèl·lules tumorals fins a l'aparició de malalties autoimmunes o degeneratives (Zhang, 1998; Haass,1999).

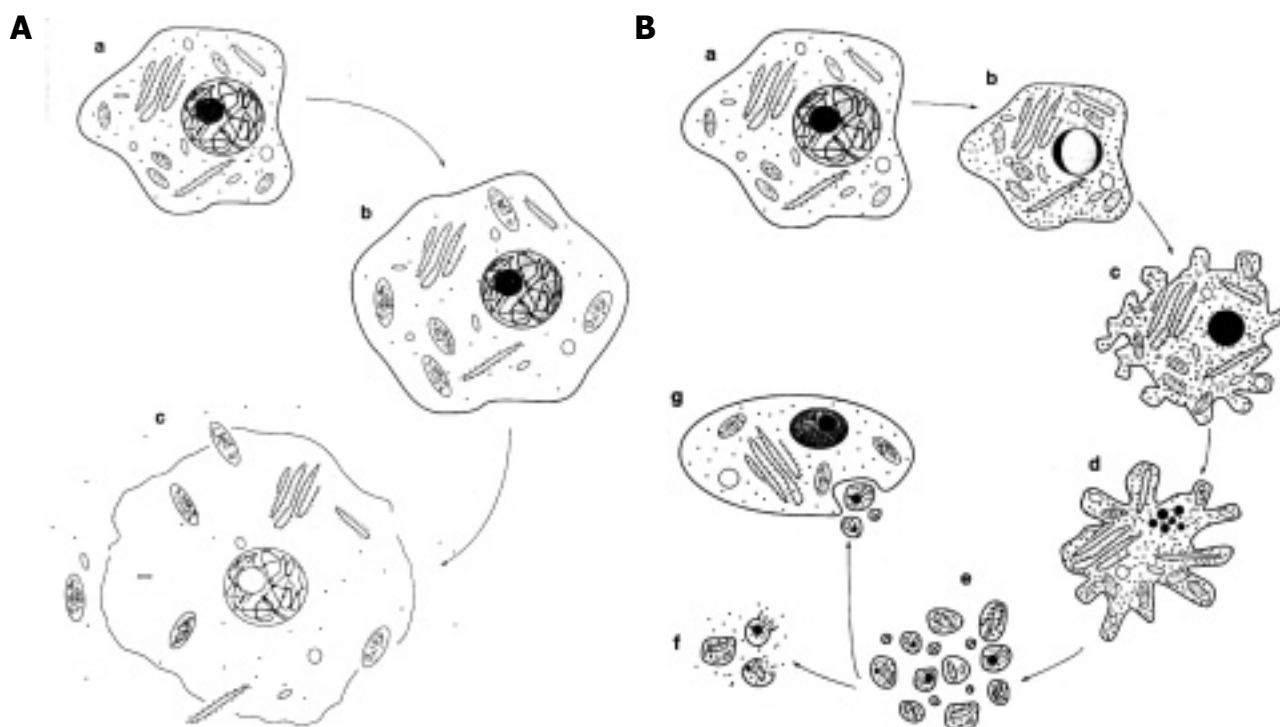


Figura 1.2. Comparació de les morts per necrosi i apoptosi. *A. Mort cel·lular per necrosi.* En el procés de mort per necrosi, una cèl·lula normal (a) comença a inflar-se (b) abans de perdre la integritat de la seva membrana i lisar (c), alliberant així el seu contingut a l'exterior. La necrosi és un procés passiu i té lloc quan les cèl·lules es troben exposades a condicions ambientals extremes com per exemple hipertèrmia, hipòxia, exposició a alts nivells de toxines, canvis bruscs de pH o altes velocitats d'agitació; les cèl·lules són incapaces de mantenir l'homeòstasi donant lloc a un influx d'aigua i ions extracel·lulars (Mastrangelo i Betenbaugh, 1998); *B. Mort cel·lular per apoptosi.* Primer, la cèl·lula normal (a) s'encongeix i la cromatina condensada forma mitges llunes al voltant de l'embolcall nuclear (b) la membrana llavors comença a protuberar (c) mentre el nucli acaba col·lapsant (d) la vessiculació s'incrementa i la cèl·lula acaba convertida en un gran nombre de còssols apoptòtics (e) que lisen *in vitro* (f) o bé són fagocitats *in vivo* (g). L'apoptosi té lloc sota condicions fisiològiques normals, éssent la cèl·lula un participant actiu de la seva pròpia mort. La inducció de la mort per apoptosi pot ser química (dexametasona, etoposide, higromicina B, estaurosporina, etc.), genètica (bcl-X_s, c-myc, p53, etc.) i bioquímica (exhauriment de nutrients, espècies d'oxigen reactives, TNF- α , etc.) (Mastrangelo i Betenbaugh, 1998).

Aquests fets són particularment rellevants en biotecnologia, ja que en l'ambient on es troba la cèl·lula hi pot haver baixos nivells de nutrients i/o de factors de creixement, així com elevades concentracions de tòxics, cadascun dels quals pot induir l'apoptosi (Dickson, 1998). Donada la naturalesa activa de la mort cel·lular en processos de cultiu, actualment, s'ha reconegut que caldria incloure mètodes per aturar l'apoptosi en les estratègies dirigides a incrementar la productivitat (Al-Rubeai et al., 1995).

1.4. La mort per apoptosi de l'hibridoma KB26.5

Els mecanismes bioquímics activats durant la mort cel·lular programada porten a la destrucció dels bastiments que mantenen l'estructura cel·lular i dels diferents orgànuls que afavoreixen les reaccions vitals en la cèl·lula. Això és reflectit en canvis morfològics i fisiològics que es presenten seqüencialment des dels estadis inicials de l'activació de l'apoptosi fins al desenllaç de la mort cel·lular (Cryns i Yuan, 1998; Enari, 1998; Mastrangelo i Betenbaugh, 1998).

En els cultius en discontinu de l'hibridoma KB26.5, existeixen diferències morfològiques molt clares entre les cèl·lules que moren per apoptosi de les que ho fan per necrosi. En estadis avançats de l'apoptosi, el material genètic de la cèl·lula es condensa, el DNA es fragmenta i l'embolcall nuclear es desestructura, adquirint unes formes lobulades molt característiques, tal i com s'esquematzava a la Figura 1.2.

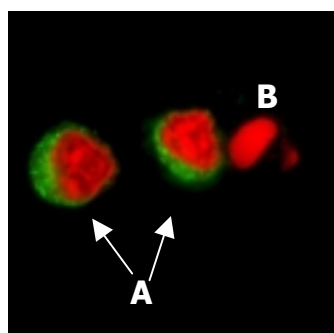


Figura 1.3. Tinció del citoesquelet de cèl·lules d'hibridoma. Les dues cèl·lules de l'esquerra (A) mostren la tinció (en verd) de l'actina en perfecte estat (mitjançant l'ús d'un anticòs monoclonal marcat amb fluoresceïna dirigit contra l'actina de ratolí); mentre que la cèl·lula de la dreta (B) té el citoesquelet desestructurat i l'anticòs no reconeix l'actina (Tintó, 1999).

Al mateix temps, hi ha una desorganització del citoesquelet (veure Figura 1.3) de manera que la cèl·lula pren una aparença cada cop més rugosa fins acabar dividint-se en petites vesícules que contenen orgànuls cel·lulars intactes i material nuclear: els anomenats *cossos apoptòtics*. Per contra, les cèl·lules que moren per necrosi incrementen el seu volum a l'haver perdut la capacitat

de regular l'entrada d'aigua i ions a la cèl·lula, molts dels orgànuls i sistemes membranosos intracel·lulars es desestabilitzen i, finalment, la cèl·lula acaba lisant (Mastrangelo i Betenbaugh, 1998).

Totes aquestes diferències morfològiques han estat observades en l'hibridoma KB26.5 i descrites àmpliament amb anterioritat per Tintó et al., 1999 (veure les Figures 1.4 i 1.5, on s'aprecien aquests canvis estructurals mitjançant l'ús de dues tècniques diferents de microscòpia: microscòpia òptica de fluorescència amb tinció amb taronja d'acridina i bromur d'etidi; i microscòpia electrònica de transmissió, respectivament).

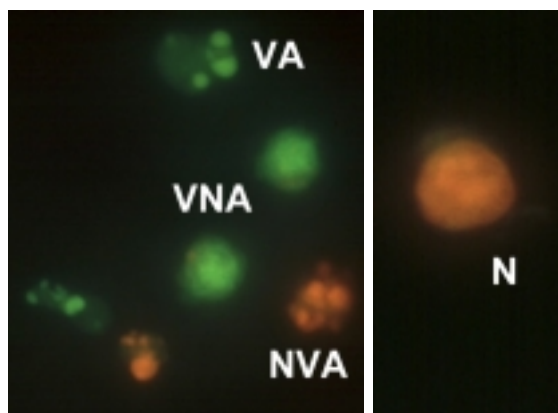
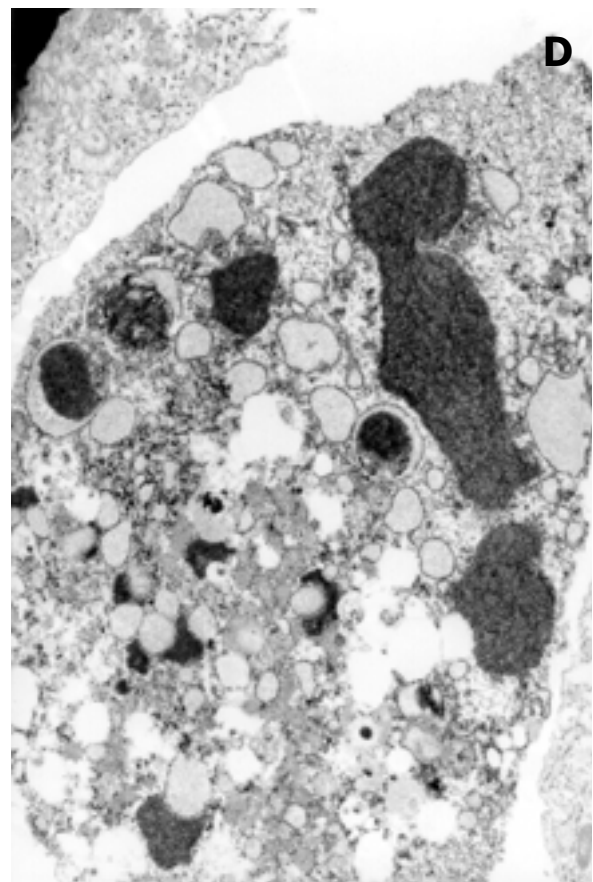
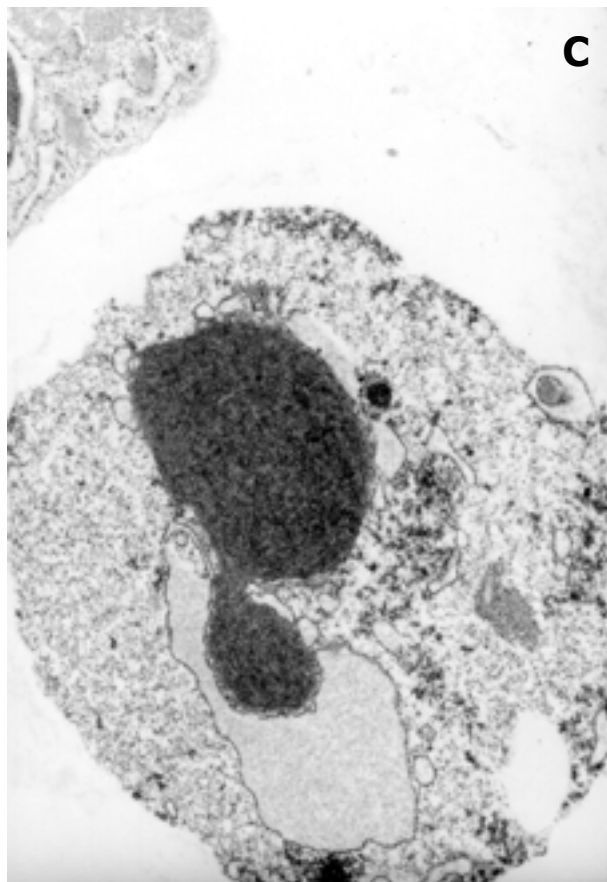
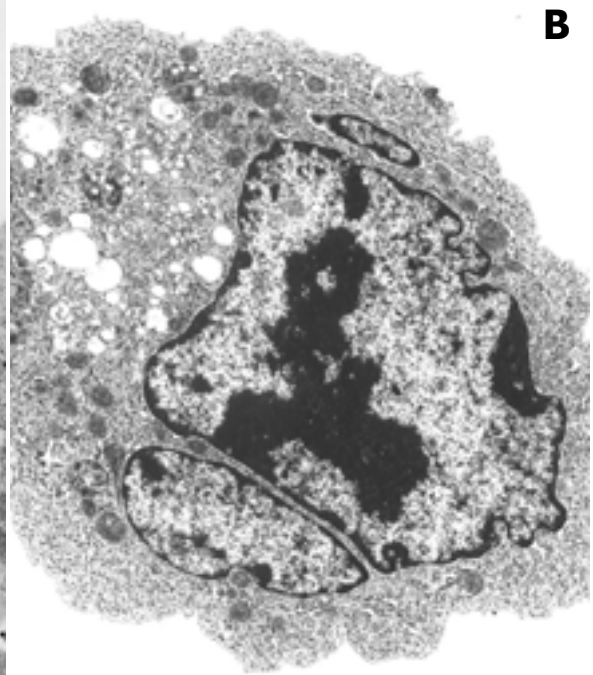
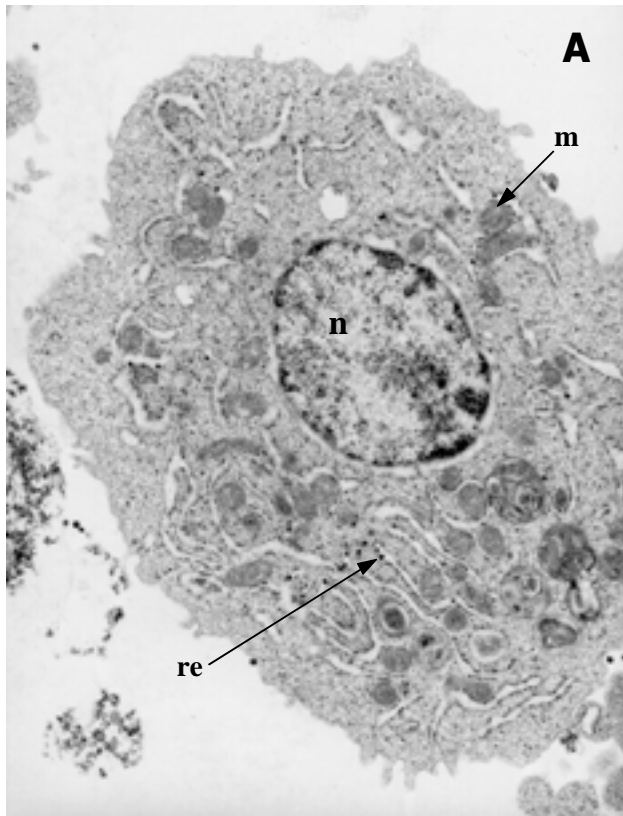


Figura 1.4. Imatge per microscòpia de fluorescència on es distingeixen les diferents morfologies cel·lulars d'una mostra d'un cultiu d'hibridomes a les 96 h amb tinció amb bromur d'etidi i taronja d'acridina. El taronja d'acridina és un colorant que entra dins les cèl·lules vives i tenyeix de color verd el DNA bicatenari i de color taronja clar el DNA monocatenari i el RNA. El bromur d'etidi únicament traspasa la membrana plasmàtica de les cèl·lules mortes i tenyeix de taronja vermellós intens el material genètic d'aquestes (Duke i Cohen, 1992; Mercille i Massie, 1994). A les imatges, es distingeixen quatre morfologies cel·lulars diferents. *VNA*, *Viables No Apoptòtiques*: el nucli queda tenyit de verd intens i, sovint, també amb petites zones d'un taronja molt suau; el nucli és rodó i s'intueix la forma arrodonida de la cèl·lula, tenyida d'un verd semitransparent; de vegades, és possible

observar una certa lobulació inicial de la membrana cel·lular i de l'embolcall nuclear, que marca la transició cap a una morfologia apoptòtica. *VA*: *Viables Apoptòtiques*: són cèl·lules vives que es troben en una fase avançada de l'apoptosi i, per aquest motiu, es veuen de color verd intens, bo i tenir unes morfologies nuclear i cel·lular irregulars i molt lobulades; poden ser més petites que les viables no apoptòtiques i, fins i tot, s'hi poden apreciar els cossos apoptòtics. *NVA*: *No Viables Apoptòtiques*: són cèl·lules que han mort per apoptosi i presenten una tinció taronja-vermellosa intensa ja que la cromatina condensada queda fortament tenyida pel bromur d'etidi, a l'haver mort per apoptosi tenen una morfologia irregular i lobulada i també poden aparèixer en forma de cossos apoptòtics. *N*: *Necròtiques*: són cèl·lules que han mort per necrosi, si la cèl·lula no ha lisat, apareix amb forma esfèrica i de color taronja difuminat que s'estén arreu de l'espai intracel·lular, probablement pel trencament del nucli i la presència del material genètic arreu del citoplasma. Quan la cèl·lula ha lisat, és difícil determinar si prové d'una mort per necrosi o és producte d'una cèl·lula apoptòtica que ha patit necrosi secundària. Fotografia presa a 400x (Tintó, 1999).

Figura 1.5. (pàgina següent) Imatges de diferents morfologies cel·lulars d'hibridomes obtingudes per microscòpia electrònica de transmissió. *A) Cèl·lula Viable*: s'observa la forma totalment esfèrica del nucli (n) en l'interior del qual el material genètic es troba poc condensat; també es diferencien clarament alguns dels principals orgànuls (m: mitocondri) i estructures cel·lulars (re: reticle endoplasmàtic); *B) Cèl·lula en una etapa inicial de l'apoptosi*: inici del procés de condensació de la cromatina al llarg de l'embolcall nuclear; el nucli comença a lobular, s'origina un nombre creixent d'invaginacions de la membrana cel·lular i la cèl·lula es contrau degut a la desestructuració del citoesquelet; els mitocondris i el reticle endoplasmàtic de la cèl·lula romanen intactes; *C) Cèl·lula en una etapa avançada de l'apoptosi*: s'observa la condensació total del material genètic, l'inici de fragmentació del nucli produït per la desorganització de l'embolcall nuclear i la desaparició dels orgànuls cel·lulars; *D) Cèl·lula en una etapa terminal de l'apoptosi*: el nucli s'ha dividit en varis fragments que, en molts casos, inclouen cromatina condensada. La cèl·lula pren una forma irregular que portarà a una posterior divisió en múltiples cossos apoptòtics.



La quantificació d'aquestes quatre morfologies cel·lulars observades al microscopi de fluorescència mitjançant la tinció amb bromur d'etidi i taronja d'acridina, encara que laboriosa, és possible a partir del recompte de les mostres en diferents camps i el posterior càlcul dels percentatges de morfologies cel·lulars de la població (Figura 1.6).

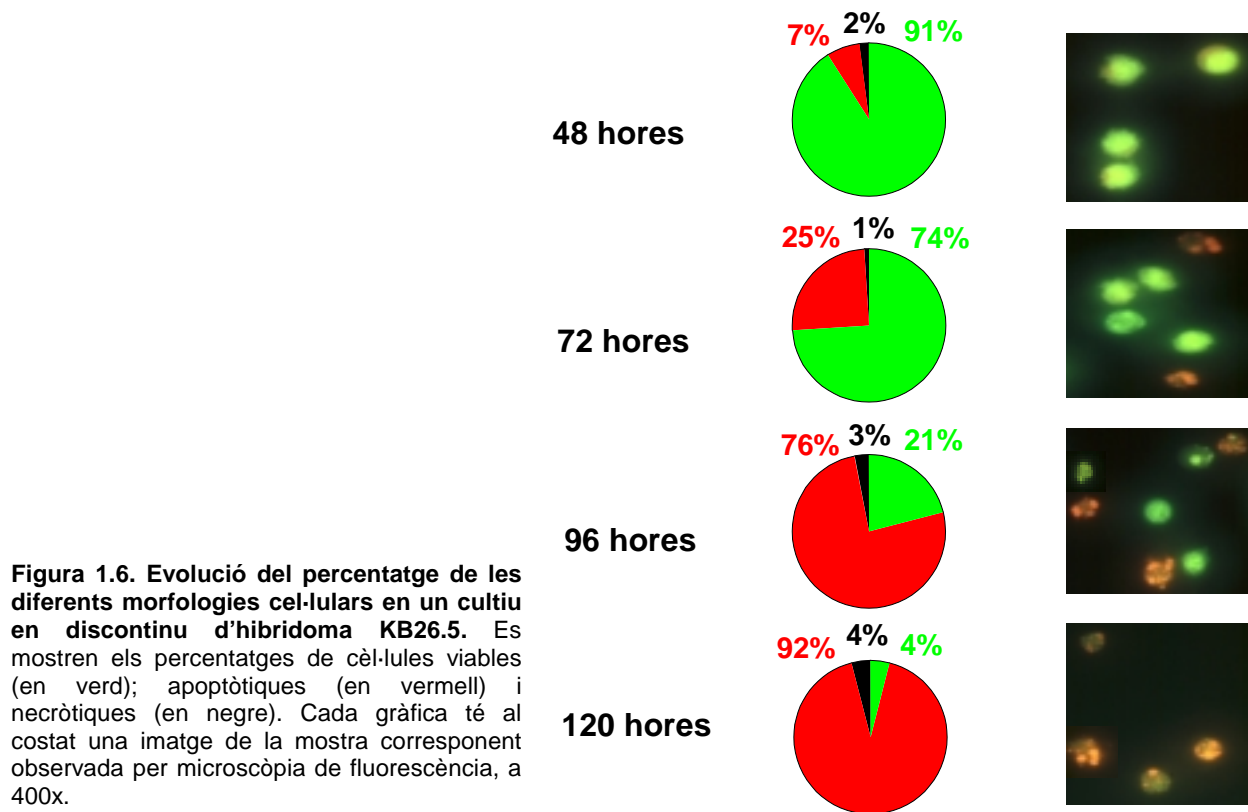


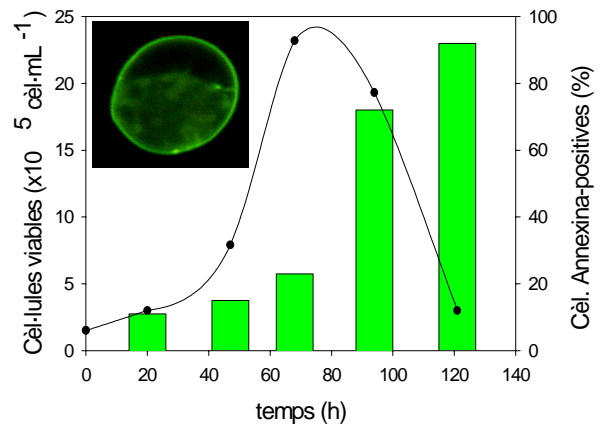
Figura 1.6. Evolució del percentatge de les diferents morfologies cel·lulars en un cultiu en discontinu d'hibridoma KB26.5. Es mostren els percentatges de cèl·lules viables (en verd); apoptòtiques (en vermell) i necròtiques (en negre). Cada gràfica té al costat una imatge de la mostra corresponent observada per microscòpia de fluorescència, a 400x.

L'activació del procés d'apoptosi en cultiu es tradueix inicialment en canvis en la composició de la membrana plasmàtica, on es dona la translocació de la fosfatidilserina –fosfolípid present a la cara interna de la membrana plasmàtica en cèl·lules no apoptòtiques, però que queda exposat a la cara externa un cop activat el procés de mort (Blankenberg et al., 1998). La detecció d'aquesta alteració es duu a terme mitjançant el marcatge amb Annexina-V-Fluos, proteïna altament específica per a la fosfatidilserina, d'unió dependent de calci. L'excitació a 488 nm de la mostra marcada provoca una emissió a 515 nm, que correspon al verd en l'espectre del visible, fet que permet la seva visualització (Blankenberg et al., 1998; Bossy-Wetzel i Green, 2000).

A la Figura 1.7, es presenta el percentatge de cèl·lules Annexina-positives així com la fotografia d'una cèl·lula que ha iniciat el procés de l'apoptosi i que presenta translocació de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica. El fet que la membrana plasmàtica no sigui permeable a l'Annexin-V-Fluos permet que el marcatge només es doni si la fosfatidilserina ha estat exposada a la cara externa de la membrana (Blankenberg et al., 1998).

En aquest estadi inicial, no s'observen altres canvis morfològics en l'estructura de la cèl·lula. Per això, aquest mètode és àmpliament utilitzat per a la determinació del percentatge de cèl·lules que es troben en fases inicials de l'apoptosi. Només requereix el marcatge amb Annexina i la quantificació de les cèl·lules marcades mitjançant citometria de flux.

Figura 1.7. Translocació del fosfolípid fosfatidilserina de la cara interna a l'externa de la membrana plasmàtica i la seva quantificació per citometria de flux. A la dreta, es mostra el percentatge de cèl·lules d'hibridoma que en un cultiu en discontinu presenten translocació de fosfatidilserina al llarg del temps, mitjançant tinció amb Annexina-V-Fluos. La fosfatidilserina és un fosfolípid de membrana que actua com a segon missatger en l'activació via receptors de membrana de tota una sèrie d'enzims entre els que s'inclouen membres de la família de la PKC (*Protein kinase C*), implicats en multitud de processos fisiològics. L'exposició de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica permet el reconeixement i la fagocitosi pels macròfags d'aquelles cèl·lules que tenen activada la PCD. A la gràfica s'hi inclou una fotografia presa per microscòpia confocal d'una cèl·lula marcada amb Annexina-V-Fluos.



Durant estadis mitjanament avançats de l'execució del programa apoptòtic en la cèl·lula, s'inicia el procés de degradació de les cadenes dobles de DNA a nivell internucleosòmic, ja que el DNA d'aquestes regions està més exposat a l'acció de les endonucleases. Una tècnica que permet detectar l'aparició d'aquesta fragmentació del DNA és l'assaig enzimàtic TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*), que consisteix en posar en contacte les cèl·lules amb un desoxinucleòtid marcat fluorescentment, en aquest cas dUTP amb fluoresceïna, i una petita quantitat de l'enzim *terminal transferasa*, que té la capacitat d'unir els desoxinucleòtids marcats als extrems hidroxílics 3' dels fragments de DNA que han estat degradats per endonucleases. D'aquesta manera, és possible detectar la presència de cèl·lules apoptòtiques per citometria de flux o per microscòpia de fluorescència o confocal (Negoescu et al. 1996; els resultats obtinguts amb l'hibridoma KB26.5 són a la Figura 1.8).

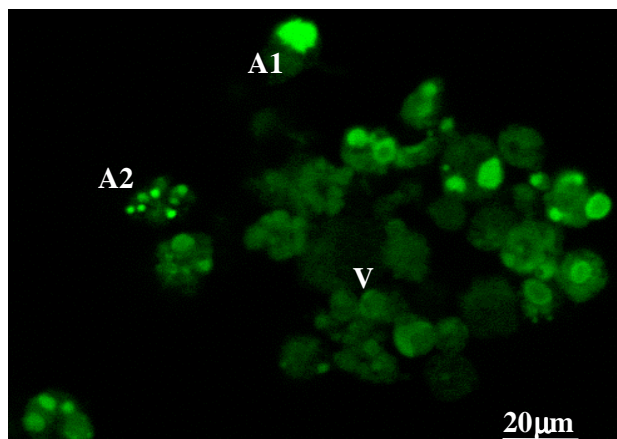


Figura 1.8. Aspecte d'un cultiu amb cèl·lules viables i apoptòtiques tractades amb l'assaig TUNEL. Les cèl·lules apoptòtiques queden marcades de color verd intens, tant si el nucli roman intacte (A1), com si ja s'ha produït la fragmentació nuclear (A2). Per contra, les cèl·lules viables únicament presenten una tènue fluorescència verda (V). La transducció del senyal apoptòtic desencadena l'activació de proteases depenents de calci, activació estimulada per l'elevada concentració d'aquest ió en el cos cel·lular compactat. Aquestes proteases són responsables de la degradació de proteïnes que conformen el citoesquelet (Zhuang et al., 1998) i de l'activació d'endonucleases que tallen el DNA en les regions internucleosòmiques (Sakahira et al., 1998).

Aquesta tècnica no té un procediment metodològic complicat (veure la descripció detallada del protocol a l'apartat 7.13.2.1 del capítol de Materials i Mètodes), però únicament permet realitzar una valoracions qualitatives de l'aparició de l'apoptosi en el cultiu equivalents a les obtingudes amb altres tècniques anteriors.

D'altra banda, s'ha fet ús de la tècnica d'anàlisi electroforètica en gel d'agarosa amb extraccions de DNA genòmic de poblacions cel·lulars. Així, es va obtenir el patró en forma d'escala característic del DNA de cèl·lules apoptòtiques, on cada esglaó correspon a un fragment de DNA de longitud múltiple de 180 parells de nucleòtids, producte del processament internucleosòmic (Wyllie, 1980; Franek et al., 1992).

Per a l'observació d'aquest fenomen en cultius en discontinu d'hibridomes, es van realitzar extraccions del material genètic de mostres a les 24 hores, corresponent a un cultiu amb una viabilitat cel·lular superior al 91%; i a les 96 hores de cultiu, que presentava un percentatge molt elevat de cèl·lules mortes per apoptosi (veure Figura 1.9).

24h 96h

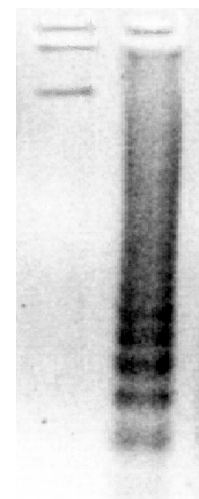


Figura 1.9. Visualització del patró de fragmentació del DNA genòmic en electroforesi en gel d'agarosa. A l'esquerra, mostra extreta a les 48 hores de cultiu, de la que es va obtenir una banda molt definida corresponent al DNA genòmic intacte de les cèl·lules viables. Com que aquest DNA havia estat extret d'una població de cèl·lules majoritàriament viables, estava del tot íntegre i per tant presentava un elevada massa molecular. A la dreta, mostra extreta a les 96 hores de cultiu, on s'hi observa un conjunt de bandes situades de manera regular en la part inferior del gel, que corresponen a fragments petits de DNA. Aquest és el típic patró de bandes en escala que es dona en cultius apoptòtics degut a la fragmentació del DNA de la cèl·lula en fragments múltiples de 180 parells de bases. També es va poder observar com part del DNA encara es trobava intacte i quedava retingut en la part superior del gel. Aquest fet indicaria que en el cultiu hi havia una proporció de cèl·lules viables o apoptòtiques en les que les endonucleases encara no havien començat a degradar el DNA.

Aquesta tècnica únicament permet visualitzar la presència de cèl·lules apoptòtiques en el total de la població d'un cultiu i, per tant, no és un mètode per a la quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques. Endemés, detecta únicament un fenomen que es produeix en estadis avançats de l'apoptosi. De totes maneres, és una tècnica amb un procediment experimental molt senzill que pot ser emprada a l'hora de verificar els resultats obtinguts amb altres tècniques, o simplement per fer un seguiment *a posteriori* del procés de mort en els cultius.

Els resultats obtinguts en aquests estudis preliminars evidencien que les cèl·lules d'hibridoma cultivades en discontinu moren per apoptosi. Alhora, aquests primers treballs van permetre la

posada a punt dels protocols experimentals per a la visualització del tipus de mort cel·lular que es dona als cultius (Gabernet, 1999; Tintó, 1999). Actualment, l'ús d'aquests mètodes ens permet obtenir informació acurada dels canvis morfològics i estructurals que pateixen els híbridomes durant la fase de mort cel·lular dels cultius així com, al mateix temps, la seva quantificació.

1.5. Determinació dels principals inductors de l'apoptosi en cultius d'híbridomes

Un cop coneguda la forma de mort dels cultius d'híbridomes, calia respondre a la pregunta de quins eren els seus inductors. Dels diferents estímuls esmentats, en el cas dels cultius *in vitro* d'híbridomes, el factor apoptòtic que cal considerar és l'exhauriment d'algun dels nutrients essencials (Franek, 1995; Simpson et al., 1998). Així, Tintó, 1999, va estudiar l'efecte de l'exhauriment dels principals nutrients del medi sobre el creixement del cultiu i la mort per apoptosi de les cèl·lules. Aquí s'incloué l'eliminació de les principals fonts de carboni, nitrogen i energia de la cèl·lula: la glucosa i la glutamina. També es va determinar l'efecte en el tipus de mort de la limitació d'oxigen i l'absència dels factors de creixement presents al sèrum.

A la Figura 1.10, es mostra l'evolució de la concentració de cèl·lules viables, el percentatge de cèl·lules Annexina-positives i la morfologia de les cèl·lules per microscòpia de fluorescència obtingudes en aquest treball previ.

Pel que fa a l'evolució de la concentració de cèl·lules viables, el control positiu va créixer fins assolir un valor màxim de 1.9×10^6 cèl·lules viables·mL⁻¹ a les 48 hores de cultiu. A partir d'aquest moment, la població cel·lular va començar a morir ràpidament degut a l'esgotament de la glutamina del medi. En canvi, i com era d'esperar, el cultiu amb medi sense glucosa no va arribar a créixer en cap moment i, a les 48 hores, ja gairebé no restaven cèl·lules viables.

Tant les cèl·lules cultivades en medi deficient en glutamina com aquelles en condicions d'hipòxia presentaven una davallada del nombre de viables més atenuada. Finalment, el cultiu sense sèrum va créixer una mica durant les primeres 24 hores i, a continuació, la concentració de cèl·lules viables va descendir lleugerament, primer, i de forma més accentuada, després.

Pel que fa al percentatge de cèl·lules Annexina-positives presents a cadascun dels cultius, s'observa que la manca de glucosa és la situació que indueix més ràpidament l'externalització de

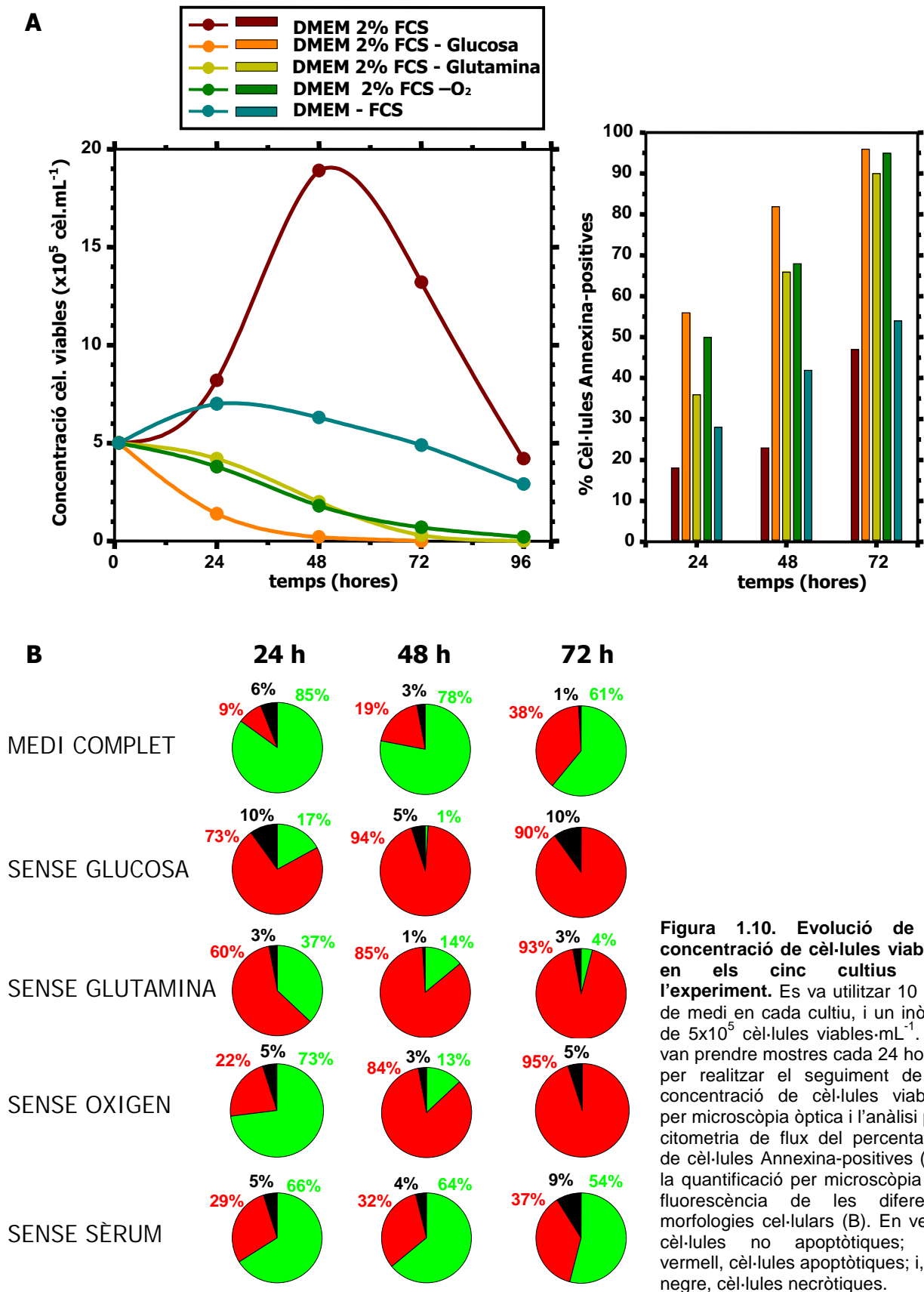
la fosfatidilserina en les cèl·lules d'hibridoma: un 55% a les 24 hores, i més d'un 90%, a les 72 hores de cultiu. Quan en el medi únicament hi mancava glutamina, la inducció de l'apoptosi no semblava aparèixer de manera tan ràpida com en el cas anterior, 45% a les 24 hores, si bé al final s'acabava assolint valors gairebé idèntics.

Al cultiu amb medi sense sèrum el percentatge de cèl·lules Annexina-positives presents va ser sempre menor que els casos anteriors; 28%, 42% i 54% a les 24, 48 i 72 hores, respectivament. Com es pot veure, l'increment en el nombre de cèl·lules que moren per apoptosi en el cultiu que no contenia sèrum va augmentar de manera constant i molt més lentament que quan es donava la manca dels altres nutrients.

El cultiu control sempre tenia el nombre més baix de cèl·lules apoptòtiques a les 24 hores, un 18%, si bé, un cop esgotada la glutamina, que és el nutrient limitant en aquests cultius el percentatge de cèl·lules Annexina-positives va incrementar més ràpidament que en el cas del medi sense sèrum; 23% a les 48 hores i 47% a les 72 hores. Pel que fa al cultiu sense oxigen, aquest presentava nivells d'apoptosi molt superiors al cultiu control. En condicions d'hipòxia, doncs, els percentatges de cèl·lules Annexina-positives sempre van ser lleugerament inferiors al que no conté glucosa, si bé finalment va ser el cultiu limitat d'oxigen el que va acabar tenint uns valors d'apoptosi lleugerament més baixos.

Pel que fa a la morfologia de les cèl·lules en els tres cultius sense glucosa o glutamina, l'aparició de percentatges elevats de cèl·lules amb morfologia apoptòtica es va donar ja a partir de les 24 hores. En aquest cas, la manca de glucosa va ser la condició que induïa de manera més ràpida l'aparició de l'apoptosi en els cultius, seguida de la manca d'únicament glutamina.

En l'observació dels cultius per microscòpia de fluorescència, es va fer evident la presència de diferents patrons morfològics de mort per apoptosi en funció de l'estímul inductor aplicat. En els cultius en absència de sèrum, les cèl·lules apoptòtiques presentaven generalment morfologies molt més arrodonides i absència de lobulació i fragmentació del nucli. En els cultius sense oxigen, s'observava a les 12 hores un percentatge de cèl·lules apoptòtiques no gaire superiors a l'observat en el cultiu control.



De totes maneres, a partir de les 36 hores la quantitat de cèl·lules apoptòtiques es va disparar ràpidament, especialment en el cultiu on el factor limitant era l'oxigen, que presentava una quantitat de cèl·lules viables no apoptòtiques lleugerament superior a la del cultiu sense glutamina, i varies vegades superior al cultiu sense glucosa. Cal destacar que les cèl·lules apoptòtiques observades en aquest cultiu tenien la mateixa morfologia que les de la resta de cultius.

En el cultiu sense sèrum, s'aprecia una evolució constant i molt més lenta de l'aparició de cèl·lules amb morfologia apoptòtica respecte els altres casos. En el cas del cultiu control, l'aparició de percentatges significatius de cèl·lules apoptòtiques es dona a partir de les 72 hores, un cop s'ha esgotat la glutamina del medi. Tant en el cultiu sense sèrum com en el control, els percentatges de morfologies apoptòtiques obtingudes estan sempre per sota dels valors de cèl·lules Annexina-positives mesurats per citometria de flux en el mateix interval de temps. Aquest fet concorda amb la teòrica seqüència d'esdeveniments que es dona en la cèl·lula durant l'execució de l'apoptosi, on la translocació de la fosfatidilserina es produeix abans que s'observi una morfologia cel·lular apoptòtica (Blankenberg et al., 1998).

Pel que fa a la translocació de la fosfatidilserina, ja a les 12 hores, el cultiu sense oxigen presentava nivells d'apoptosi molt superiors al cultiu control. En el cultiu en condicions d'hipòxia, els percentatges de cèl·lules Annexina-positives sempre van ser lleugerament inferiors al que no contenia glucosa, si bé finalment va ser el cultiu limitat d'oxigen el que va acabar tenint uns valors d'apoptosi una mica més baixos.

A la Figura 1.11, es mostra un gel d'agarosa amb mostres de DNA extret de les cèl·lules dels cinc cultius de l'experiment. Els cultius amb medi sense glucosa, sense glutamina i en condicions d'hipòxia mostren una clara fragmentació del DNA en patró d'escala. Per contra, en el cultiu control només va començar a apreciar-se una certa degradació del DNA a les 72 hores, mentre que les mostres dels cultius sense sèrum únicament mostraven una banda de DNA a la part superior del gel, igual que el cultiu control a les 24 hores, senyal que el DNA de les cèl·lules es mantenia intacte. Cal destacar que, en el cas del cultiu sense sèrum, s'havia pogut constatar prèviament que la concentració de glutamina era ja molt baixa. A les 24 hores, ja s'havia iniciat la fragmentació del DNA de les cèl·lules cultivades en condicions d'hipòxia, a diferència del cultiu control, on no s'apreciava aquesta degradació.

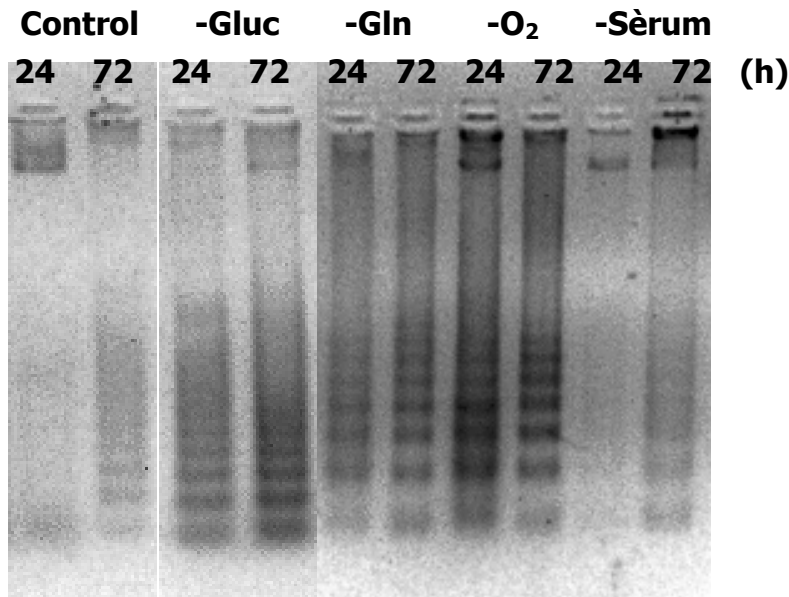


Figura 1.11. Gel d'agarosa on es mostra l'estat del DNA de les cèl·lules en els diferents cultius de l'experiment. Extraccions de DNA genòmic procedent de cèl·lules cultivades en medi DMEM complet, sense glucosa, sense glutamina, sense sèrum i en condicions d'hipòxia. En tots els casos s'han realitzat extraccions en mostres a les 24 i 72 h.

Aquests resultats indiquen que la manca de glucosa, glutamina, oxigen i sèrum són estímuls inductors de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5. De totes maneres, en funció del tipus d'inducció de l'apoptosi que es doni, la mateixa línia cel·lular pot desenvolupar de forma diferent l'execució del seu programa apoptòtic.

En el cas d'absència d'oxigen o d'algun nutrient essencial, com la glutamina o la glucosa, el procés apoptòtic és molt ràpid i totes les estructures cel·lulars en queden afectades. Per tant, es poden apreciar totes les alteracions morfològiques típiques de l'apoptosi: lobulació de la membrana plasmàtica, forma irregular de la cèl·lula, translocació de la fosfatidilserina, condensació de la cromatina, fragmentació del nucli i degradació del DNA en patró d'escala (Mastrangelo i Betenbaugh, 1998).

Per contra, en absència de sèrum les cèl·lules també entren en apoptosi, però molt més lentament. Per aquest motiu, en moltes de les cèl·lules mortes únicament s'aprecia la translocació de la fosfatidilserina i la condensació de la cromatina.

L'aparició d'altres fenòmens com la desestructuració del nucli i la fragmentació del DNA només es donen si hi ha manca d'algun nutrient fonamental com la glucosa i la glutamina, o bé limitació de subministrament d'oxigen. Així doncs, és molt possible que la inducció de l'apoptosi per manca de sèrum es desenvolupi per rutes intracel·lulars diferents que per manca de glutamina o glucosa i que, per tant, els mecanismes d'autodestrucció activats en una cèl·lula per

la manca de sèrum siguin només una part dels que es donen per la manca de nutrients fonamentals com la glucosa o la glutamina.

La importància de les rutes metabòliques que la cèl·lula utilitza per a la síntesi energètica en la inducció de l'apoptosi queda palesa en els experiments en absència d'oxigen en els quals la PCD es dona per l'efecte específic sobre el funcionament de la cadena transportadora d'electrons (Tintó, 1999).

A partir d'aquests resultats es pot extreure que la desactivació de les vies de síntesi energètica de la cèl·lula té una gran importància en la inducció de l'apoptosi, ja que en condicions on únicament s'inhibia parcialment aquesta ruta metabòlica (condicions d'hipòxia), l'apoptosi s'executava molt ràpidament. D'aquesta manera, caldria esperar que en els altres sistemes d'inducció, manca de glucosa o glutamina, on l'execució de l'apoptosi es dona de manera tan o més ràpida, l'inici del procés de mort cel·lular programada també és donés en gran mesura per aquesta mateixa causa, tot i que la interrupció de les principals vies de síntesi de les diferents biomolècules (proteïnes, àcids nucleics, lípids i glúcids) també podrien tenir una gran importància.

1.6. Relació entre metabolisme i apoptosi

Com s'ha mostrat en l'apartat anterior, la principal causa inductora d'apoptosi en cultius en discontinu de l'hibridoma KB26.5 és la manca d'alguns dels principals nutrients del medi, fonamentalment glutamina i glucosa. Aquest fet ens porta a considerar l'existència d'una relació molt estreta entre el metabolisme cel·lular i el procés d'inducció de l'apoptosi. A la figura 1.12, es mostra un esquema de quines són les principals rutes metabòliques que segueixen la glutamina i la glucosa en un hibridoma.

La glucosa és un dels nutrients essencials de l'hibridoma, ja que és la seva principal font de carboni i energia (Paredes, 1998). Per una banda, la glucosa que entra a la cèl·lula pot ser emprada en el procés catabòlic de la glucòlisi per generar dues molècules de piruvat, ATP i poder reductor en forma de NADH. En les cèl·lules d'hibridoma i en condicions aeròbies, aproximadament un 90% d'aquest piruvat és metabolitzat finalment a lactat (Paredes et al., 1998). La resta es transforma en acetil-CoA, que és incorporat al mitocondri per portar a terme el

cicle dels àcids tricarbòxílics, obtenir poder reductor en forma de NADH i FADH₂, i oxidar-lo finalment a CO₂. Les molècules de NADH+H⁺ i FADH₂ obtingudes en el cicle dels àcids tricarbòxílics són emprades per alimentar les múltiples reaccions d'oxidació i reducció de la cadena transportadora d'electrons que, en presència d'O₂ com a acceptor final d'electrons, dona H₂O i permet la síntesi d'ATP a partir del procés de la fosforilació oxidativa. La glucosa també és el principal substrat en molts processos anabòlics cel·lulars i actua com a base estructural per a la síntesi d'altres sucres (monosacàrids, oligosacàrids i polisacàrids) i també, a través de la via de les pentoses fosfat, contribueix a la síntesi de ribosa, un dels components dels nucleòtids. A més a més nodreix, de manera indirecta a través del cicle dels àcids tricarbòxílics, la síntesi dels àcids grassos que formen part de molts lípids (Stryer, 1995).

La glutamina és la principal font de nitrogen per l'hibridoma, així com a font alternativa de carboni i energia. Un cop dins la cèl·lula, pot ser utilitzada en la síntesi de proteïnes, altres aminoàcids o bases nitrogenades que formaran part dels nucleòtids. També pot formar part de les reaccions d'obtenció d'energia a partir de la formació inicial d'àcid glutàmic i amoni, i la posterior entrada d'aquest àcid glutàmic al cicle dels àcids tricarbòxílics.

Com es pot veure, tant la glucosa com la glutamina participen en la majoria de reaccions del metabolisme de la cèl·lula i, per tant, coincideixen i interaccionen en molts dels processos catabòlics (cicle dels àcids tricarbòxílics) i anabòlics d'aquesta. Així, glucosa i glutamina són imprescindibles per nodrir d'energia la cèl·lula (ATP) i sintetitzar els diferents components cel·lulars: glúcids, lípids, proteïnes i àcids nucleics. No és estrany, doncs, que la seva absència desencadeni de manera molt ràpida i dràstica el procés de mort per apoptosi.

1.7. Importància de les diferents rutes metabòliques en el procés d'inducció de l'apoptosi

Una de les conclusions que es pot extreure de les proves realitzades amb cultius en absència d'oxigen és que la interrupció de la via de síntesi energètica és possiblement el principal factor inductor de l'apoptosi en els hibridomes. Aquest fet no és gens estrany, ja que la cèl·lula necessita d'energia en forma d'ATP per poder portar a terme qualsevol dels seus processos cel·lulars i mantenir l'homeostasi.

De totes maneres, la cèl·lula també requereix de la presència d'ATP per executar l'apoptosi, ja que aquest és un procés actiu que precisa d'un cert consum energètic. De fet, sembla ser que el nivell d'ATP present en la cèl·lula és un dels factors determinants de l'inici d'un procés de mort per apoptosi o necrosi en molts tipus de cèl·lules (Nicotera et al., 1998).

Això fa pensar que molt possiblement, en l'hibridoma KB26.5, la interrupció dels processos de síntesi d'ATP pot tenir gran importància a l'hora d'iniciar els esdeveniments que porten a la mort per apoptosi, de manera que l'existència d'aquest estímul proapoptòtic faria que totes les reserves energètiques de les que disposa la cèl·lula, abans d'exhaurir-se algun dels seus nutrients essencials, fossin redirigides a dur a terme el programa apoptòtic.

En el cas de la manca de glucosa, la mort per apoptosi es donaria molt més ràpidament, ja que la cèl·lula no tindria la possibilitat de sintetitzar ATP a través de la degradació d'aquest sucre a lactat via glucòlisi (Figura 1.12).

És important destacar que la interrupció de la via de síntesi energètica en les cèl·lules dels cultius sense oxigen, glutamina o glucosa es dona a nivell de les etapes mitocondrials. Aquest fet pot ser de gran importància, ja que s'ha demostrat que aquest òrganul juga un paper clau en el procés d'execució de l'apoptosi (Hirsch et al., 1997; Green i Reed, 1998; Susin et al., 1998). És possible, doncs, que la connexió entre metabolisme i apoptosi es doni a nivell mitocondrial.

A més a més, cal tenir en compte la importància parcial de la interrupció d'altres processos metabòlics cel·lulars en l'execució d'apoptosi. Així doncs, la manca de síntesi de nucleòtids pot interrompre els processos de replicació del DNA i síntesi d'altres àcids nucleics; l'absència d'aminoàcids, aturar el procés de fabricació de proteïnes; i l'absència de síntesi de lípids o sucres, impedir altres processos metabòlics o la regeneració de les estructures cel·lulars. Tots aquests altres fenòmens podrien actuar de manera conjunta a la fallida de la síntesi energètica, o bé podrien ser una conseqüència immediata d'aquest fet, ja que la presència d'ATP és imprescindible per tal de portar a terme totes aquestes rutes anabòliques.

Cal destacar també que, paral·lelament a l'execució de l'apoptosi, en l'hibridoma KB26.5 es dona l'aturada del cicle cel·lular a les fases G1 o S (Tintó, 1999). Aquest fet és segurament conseqüència de les mateixes restriccions metabòliques que activen l'apoptosi en l'hibridoma, si

bé no es descarta que, en el cas d'inducció per manca de sèrum, l'aturada del cycle cel·lular pugui actuar com a principal via iniciadora del procés apoptòtic.

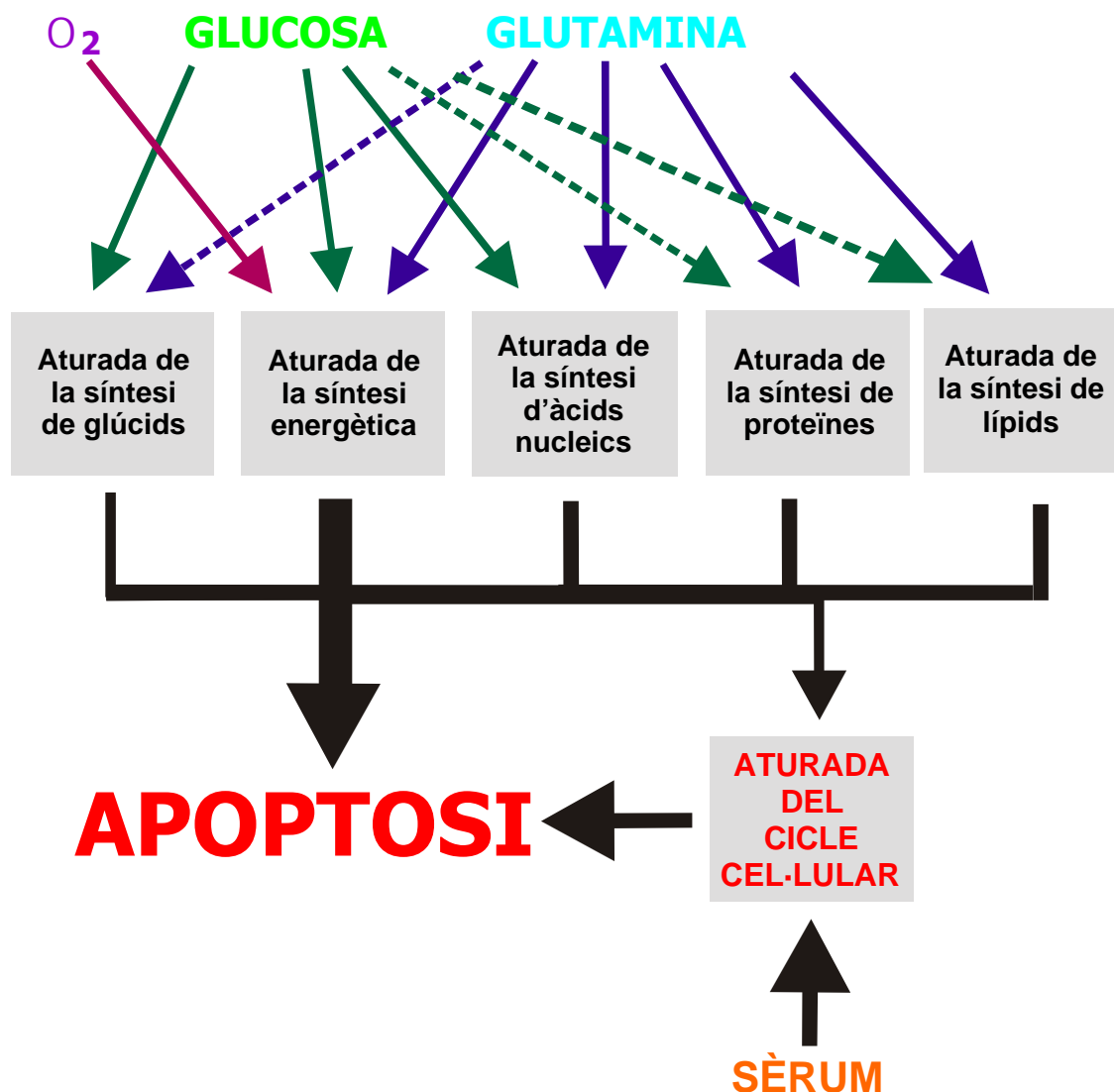


Figura 1.12. Esquema de la importància de les diferents rutes metabòliques cel·lulars en la inducció de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5. La glutamina metabolitzada en l'hibridoma com a font energètica, és parcialment oxidada a glutamat i posteriorment a piruvat després de recórrer part del cycle dels àcids tricarbòxílics (Paredes, 1998). A partir del piruvat, els àtoms de carboni de la glutamina poden contribuir a la formació de lípids o de lactat. S'ha estimat que entre el 30 i el 65 % dels requeriments energètics de la cèl·lula es deriven del metabolisme de la glutamina encara que la cèl·lula disposi d'altres fonts energètiques en el medi (Paredes et al., 1998).

1.8. Estratègies per evitar la mort per apoptosi en els bioreactors

Des del començament d'aquesta memòria, s'ha presentat el cultiu *in vitro* de cèl·lules animals com la manera més apropiada de produir grans quantitats de proteïnes d'interès en els camps de la diagnòsi mèdica i la terapèutica. I així és. Ara bé, els requeriments nutritius del cultiu de

cèl·lules animals són molt més complexes en comparació amb els del cultiu de microorganismes i, per tant, molt més cars. Si a aquest fet s'hi afegeixen les baixes productivitats assolides, es fa evident la necessitat d'optimitzar els aspectes relacionats amb el cultiu *in vitro* d'aquestes cèl·lules, amb l'objectiu d'augmentar el rendiment i fer-los viables econòmicament.

A la Figura 1.13, es mostra la producció d'anticòs monoclonal (MAb) i la concentració de cèl·lules viables presents al cultiu. És clara la proporcionalitat d'ambdues variables. Així, si bé una manera d'optimitzar la producció d'anticòs monoclonal dels cultius *in vitro* d'hibridomes és augmentant la productivitat específica d'anticòs per cèl·lula, una altra possibilitat és augmentar la concentració màxima de cèl·lules i la durada total del cultiu.

En cultius en discontinu d'hibridomes, en els quals el medi conté elevades concentracions de nutrients essencials, s'observa la tendència que tenen les cèl·lules a consumir molt ràpidament la glucosa i, sobretot, la glutamina, que acostuma a ser el nutrient que s'esgota primer (Sanfeliu et al., 1996; veure Figura 1.14).

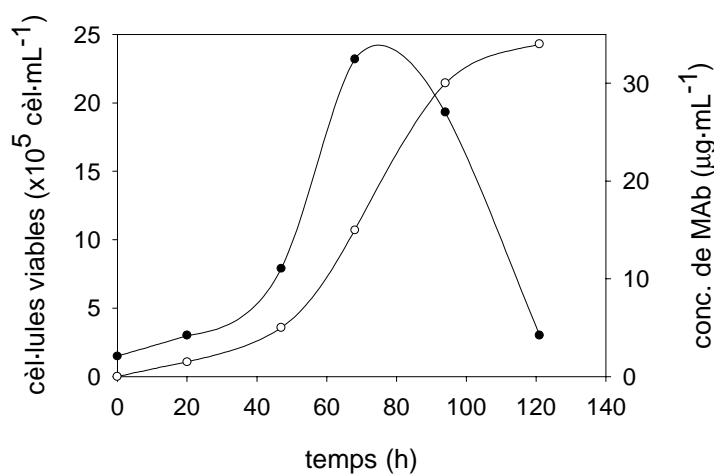


Figura 1.13. Perfil de concentració de cèl·lules viables (●) i concentració d'anticòs (○) al llarg del cultiu limitat per glucosa de cèl·lules d'hibridoma KB26.5. La concentració d'anticòs monoclonal present al medi és directament proporcional a la concentració cel·lular del cultiu. És clara doncs la necessitat d'allargar la vida dels cultius i augmentar així la productivitat del procés. En cultius en discontinu d'hibridomes en bioreactors, es poden assolir concentracions finals d'anticòs d'entre 30 a 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tant la glucosa, via glucòlisi, com la glutamina, via glutaminòlisi, són nutrients que aporten energia a la cèl·lula i contribueixen a la fabricació de macromolècules cel·lulars. Malauradament, aquestes cèl·lules obtenen rendiments energètics bastant baixos de l'aprofitament de les principals fonts de carboni i energia del medi, ja que tendeixen a malbaratar-les produint subproductes cel·lulars com el lactat o l'amoni, que a elevades concentracions poden arribar a ser tòxics per la cèl·lula (Ozturk et al., 1992).

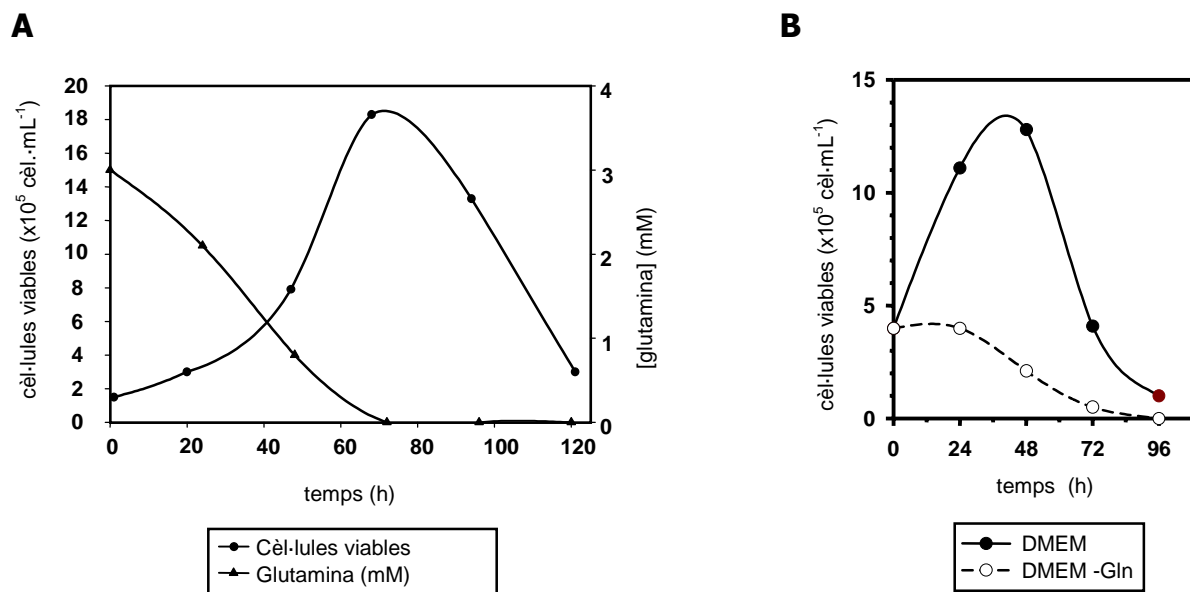


Figura 1.14. Medis sense glutamina, model d'estudi per a la inducció de l'apoptosi en l'hibridoma KB 26.5 en cultius en discontinu. A. Efecte de l'exhauriment de la glutamina en la concentració de cèl·lules viables: la manca de glutamina -principal font d'energia metabòlica així com a precursor imprescindible per a la síntesi de nucleòtids en limfòcits, fibroblasts i macròfags (Neu et al., 1996)- és el factor desencadenant de l'entrada del cultiu en la fase de mort. B. Comparació del cultiu d'hibridoma en medi DMEM 2% FCS complet, i en medi DMEM 2% FCS sense glutamina: És evident l'efecte que té la manca de glutamina en l'activació de la mort cel·lular dels hibridomes cultivats en aquestes condicions.

Els treballs que s'han realitzat fins ara dins del grup de recerca en el qual s'inclou aquesta tesi han estat orientats a la millora de la productivitat del cultiu mitjançant estratègies que permetin augmentar la concentració cel·lular i la durada del cultiu dirigint els esforços a la fase de creixement exponencial. Aquestes estratègies són bàsicament de tres tipus: la millora de les variables extracel·lulars mitjançant l'ús d'estratègies de cultiu alternatives al cultiu en discontinu, aplicant els coneixements i les tècniques pròpies de l'Enginyeria Bioquímica, basades concretament en el monitoratge i control del procés; la reformulació del medi de cultiu, que depèn en gran mesura de la línia cel·lular escollida; i l'optimització de processos bioquímics intracel·lulars a partir de la modificació genètica de la cèl·lula, utilitzant tècniques de Biologia Molecular.

Cal remarcar que les tres estratègies són del tot complementàries i poden ser aplicades paral·lelament per tal d'assolir un objectiu final comú, l'optimització del cultiu *in vitro* (Bailey, 1991).

1.8.1. Optimització de les variables extracel·lulars i del sistema de cultiu

L'estratègia de cultiu emprada és un factor clau a l'hora d'obtenir un millor rendiment del procés. El cultiu *in vitro* de cèl·lules animals es pot realitzar mitjançant dos sistemes diferents:

cultius homogenis, on les cèl·lules creixen en suspensió en el medi i en els quals es poden aplicar estratègies de cultiu en discontinu, discontinu alimentat i continu; i *cultius heterogenis*, on les cèl·lules es troben confinades dins del bioreactor i en els quals s'acostuma a utilitzar una estratègia en perfusió. Cadascuna d'aquestes estratègies comporta avantatges i inconvenients i el seu ús vindrà determinat, en cada cas, pel cost de l'operació, la capacitat de control del sistema de cultiu, el cost de purificació i la concentració necessària del producte obtingut. Excepte en el cas dels cultius en continu sense retenció cel·lular, en la resta hi ha una gran acumulació de cèl·lules i, per tant, exhauriment de components del medi que pot portar a la inducció de la PCD i acumulació de subproductes que poden arribar a ser tòxics per a les cèl·lules.

Els *cultius en discontinu* (Figura 1.15A) es realitzen subministrant tots els nutrients al moment inicial del cultiu, per tant el cultiu arriba al seu final quan un dels nutrients s'exhaureix o algun producte inhibitori sobrepassa la concentració límit per la cèl·lula. Els avantatges del sistema de cultiu en discontinu són la seva simplicitat i un risc de contaminació relativament baix. Els seus principals inconvenients estan en les condicions canviants durant tot el procés i en la baixa productivitat volumètrica degut al curt període de temps en que s'està a concentracions cel·lulars elevades.

En els *cultius en discontinu alimentat* (Figura 1.15B), hi ha un subministrament de medi de cultiu fins que s'assoleix el volum màxim del reactor o la mort per acumulació de productes tòxics. L'addició de medi permet regular la concentració dels substrats i evitar l'exhauriment d'aquests, a diferència d'un cultiu en discontinu, fet que fa possible el prolongar la fase de creixement de les cèl·lules.

A escala de laboratori, s'ha pogut incrementar fins a 10 vegades la concentració de producte en comparació amb cultius en discontinu (Robinson, 1994; Xie i Wang, 1994a,b; Zhou et al., 1995). Aquest sistema de cultiu requereix, però, una addició controlada de medi per assolir les condicions òptimes de cultiu, evitant d'una banda l'exhauriment dels seus components i d'altra banda la seva acumulació excessiva, el que fa que sigui un sistema més complex que el discontinu.

Els *cultius en continu* (Figura 1.15C) es caracteritzen per un subministrament constant de medi fresc al reactor. Al mateix temps que entra s'està extraient medi del reactor amb el mateix cabal. Aquest corrent de sortida, però, conté cèl·lules en suspensió. El cultiu en continu permet treballar

en estat estacionari durant extensos períodes de temps, en els quals es poden ajustar els paràmetres de cultiu variant la velocitat d'alimentació i extracció de medi o les concentracions dels components dels medis al corrent d'entrada al reactor. Les característiques d'aquest sistema de cultiu el fan especialment adequat per la investigació de la fisiologia cel·lular, així s'han determinat velocitats de creixement (Hayter et al., 1993), l'efecte de la concentració de glucosa (Hayter et al., 1992; Sanfeliu, 1995) i glutamina (Schmid i Künnecke, 1990; Sanfeliu, 1995) i concentració d'aminoàcids i vitamines (Hiller et al., 1994).

De totes maneres, l'aplicació d'aquest sistema de cultiu a processos de producció topa amb una sèrie d'inconvenients. La densitat cel·lular que se n'obté és relativament baixa ja que contínuament es van perdent cèl·lules pel corrent de sortida, a més a més del risc de contaminació és elevat, tant per la llarga durada del cultiu com per la contínua addició de medi. D'altra banda no és una bona estratègia per a la producció a escala industrial degut a les baixes densitats cel·lulars assolides i l'elevat cost de la purificació del producte per la seva gran dilució

Per evitar aquests inconvenients, s'han desenvolupat els anomenats *cultius en perfusió* (Figura 1.15D), que són sistemes en continu en els quals les cèl·lules són retingudes en el reactor, el que permet la producció en estat estacionari durant llargs períodes i amb alta densitat cel·lular. En cultius en perfusió realitzats amb cèl·lules d'hibridoma KB26.5 confinades dins el bioreactor mitjançant un mòdul extern de retenció cel·lular, s'han assolit densitats cel·lulars de l'ordre de $2 \cdot 10^7$ cèl·lules·mL⁻¹ (Gàmez, 2000).

Donat el gran interès que es té en assolir elevades densitats cel·lulars com a estratègia per augmentar la producció, la limitació de nutrients i oxigen és inevitable en algun moment de la fermentació.

Un punt conflictiu tant del sistema de cultiu en perfusió com del sistema en continu rau en la possible inestabilitat genètica de la cèl·lula durant el període de cultiu (Werner et al., 1992; Martens et al., 1993), fet que imposa restriccions a l'hora de la validació de processos industrials amb sistemes de producció d'aquesta mena.

Tret de l'estratègia de cultiu en continu, en tota la resta d'estratègies s'observa limitació de nutrients i/o oxigen a elevades densitats cel·lulars i acumulació de subproductes tòxics. Aquest

fet és el desencadenant de la PCD i es fa necessari un altre tipus d'actuació sobre el medi de cultiu i les cèl·lules per evitar la pèrdua del cultiu.

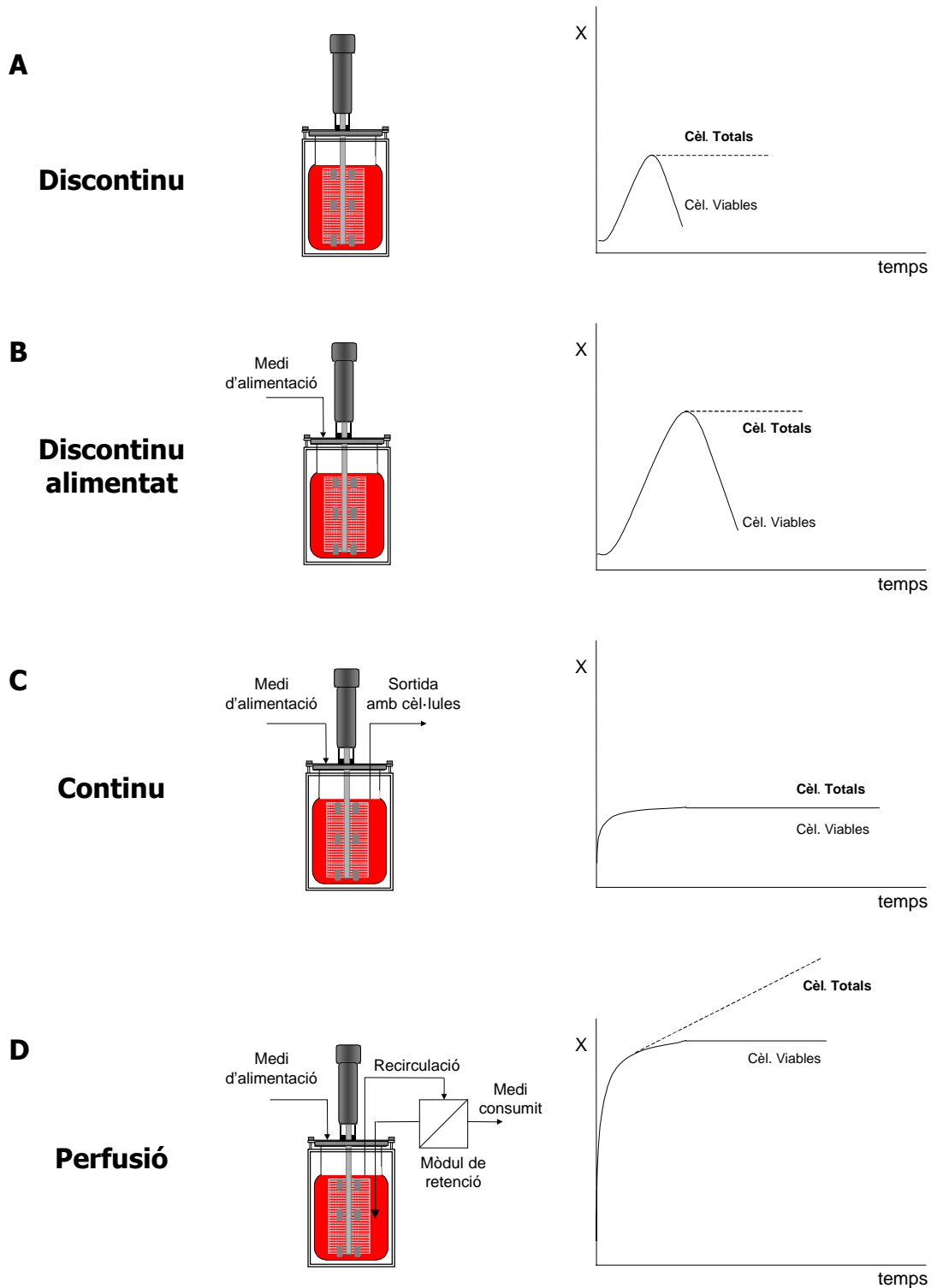


Figura 1.15. Representació esquemàtica dels diferents tipus d'estratègies de cultiu utilitzades comunament. La 'X' de l'eix de les abscisses representa la concentració de cèl·lules. Els detalls sobre cada tipus d'estratègia es troben al text.

1.8.2. Reformulació del medi de cultiu

La glucosa, així com la glutamina, són ràpidament consumides pels híbridomes (Paredes, 1998; Vives, 1999). Això ha propiciat l'ús d'altres fonts d'energia, carboni i nitrogen alternatives que siguin lentament metabolitzables de manera que s'evitin els ràpids consums que s'obtenen i reduir així l'acumulació de subproductes del seu metabolisme, bàsicament lactat i amoni (Altamirano, 2000).

Això permet optimitzar el metabolisme de l'híbridoma i allargar la fase de creixement exponencial. Per contra, però, la substitució completa de la glucosa per una altre hexosa pot alterar la glucosilació del producte (Moellering, 1990) i no sempre s'obtenen els mateixos nivells de creixement.

També és conegut l'efecte de l'addició de l'activitat glutamina sintetasa en l'híbridoma KB26.5 mitjançant enginyeria genètica per fer-lo créixer en medis de cultiu amb glutàmic enlloc de glutamina (Paredes et al., 1999). D'aquest tipus d'aproximació genètica se'n donaran més detalls a l'apartat següent.

Semblaria lògic pensar que els problemes derivats de l'exhauriment de la glucosa i la glutamina podrien evitar-se afegint més substrats al medi. Malauradament, aquesta estratègia no és vàlida per la glutamina, ja que és una molècula poc soluble, es degrada parcialment en amoni en les condicions de cultiu -i aquest és un potent inhibidor del creixement cel·lular- i, en elevades concentracions, és malbaratada per les cèl·lules, fet que porta a un augment de la presència de subproductes tòxics (Ozturk et al., 1992; Paredes et al., 1999).

La combinació de l'estratègia de cultiu en perfusió i la reformulació del medi permet la introducció d'un nou concepte d'estratègia de cultiu, la *perfusió bifàsica*, que es caracteritza per deixar créixer les cèl·lules fins una densitat determinada i, a partir de llavors, realitzar un canvi de medi que permeti alentir el creixement cel·lular, limitant d'aquesta forma el consum desmesurat de nutrients destinat a la divisió cel·lular i oferint a les cèl·lules les condicions òptimes per al manteniment de la densitat cel·lular i la producció del producte d'interès.

Una altra alternativa és intervenir en els senyals específics d'una determinada cascada de transducció del senyal o modular l'acció de proteïnes clau presents en la via executora.

1.8.3. Optimització del processos bioquímics intracel·lulars

Malgrat tot, tal i com s'ha explicat al llarg d'aquest capítol, quan els híbridomes són cultivats *in vitro*, i com a resultat de la poca disponibilitat de nutrients o l'acumulació de subproductes tòxics l'activació de la PCD impedeix la progressió del cultiu.

Això ha fet augmentar l'interès en la manipulació genètica de la maquinària cel·lular activada durant el procés de mort per apoptosi per prevenir-lo i allargar d'aquesta forma la vida dels cultius i, en conseqüència, millorar tant la viabilitat cel·lular com la productivitat del procés (Itoh et al., 1995; Simpson et al., 1997; Charbonneau et al., 2000).

Les cèl·lules es cultiven normalment fora de context (medis altament rics), el que provoca un comportament metabòlic desregulat, com s'ha demostrat pel propi híbridoma amb anterioritat (Paredes, 1998), caracteritzat per un consum molt elevat de glucosa i glutamina que requereix d'una optimització bioquímica intracel·lular. Aquesta optimització de les condicions de cultiu es pot assolir amb la modificació raonada dels fluxos metabòlics cel·lulars mitjançant tècniques de modificació genètica (Bailey, 1991; Fussenegger, 1998; Vives, 1999).

Aquestes tècniques són utilitzades per a la millora de la fase de creixement cel·lular, tant en l'optimització racional del medi de cultiu com en la modificació dels fluxos metabòlics mitjançant tècniques de Biologia Molecular, per tal d'obtenir un comportament diferent de les cèl·lules i augmentar la fase de creixement exponencial.

Aquest treball se centra en l'alteració de la ruta central a través de la qual s'executa el procés de mort, tot optimitzant el procés de cultiu cel·lular amb la modificació de processos bioquímics intracel·lulars per tal d'obtenir línies d'híbridoma millor adaptades a variacions o pertorbacions en el sistema de cultiu escollit, com s'explicarà al Capítol 3. Això és complex donat el gran nombre de gens activadors i inhibidors que hi estan implicats (Itoh et al., 1995; Yuan, 1995; Singh et al., 1996; Mercille et al., 1999). L'ús de tècniques de Biologia Molecular per a la sobreexpressió de gens inhibidors o la inhibició de gens activadors de l'apoptosi representa una opció prou vàlida a l'hora de retardar l'inici de l'etapa de mort cel·lular i aconseguir d'aquesta manera allargar la durada del cultiu (Dickson, 1998).