

4. PROTECCIÓ I RECUPERACIÓ DE CULTIUS D'HIBRIDOMA MITJANÇANT REFORMULACIÓ DEL MEDI DE CULTIU

4.1. Aturada del cicle cel·lular en cultius de cèl·lules animals

A la introducció d'aquest treball, s'han detallat els principals factors inductors de la mort per apoptosi dels hibridomes cultivats en bioreactors. Així, s'ha vist que l'exhauriment d'algun dels nutrients essencials continguts al medi provoca la interrupció de les principals vies metabòliques de la cèl·lula, ja que tant la glucosa com la glutamina són fonamentals per al correcte desenvolupament dels processos catabòlics i anabòlics cel·lulars. S'ha mostrat també que concentracions excessivament baixes d'oxigen dissolt provoquen una potent inducció de l'apoptosi de manera que, molt probablement, la interrupció de les vies de síntesi energètica cel·lulars sigui també una causa principal d'activació de la PCD, tot i que l'aturada de la síntesi de nucleòtids, proteïnes i altres biomolècules poden actuar de manera conjunta.

L'estratègia de cultiu ideal és doncs aquella que garanteixi la presència constant de concentracions adequades de tots els nutrients essencials per a la cèl·lula per evitar l'acumulació de cèl·lules mortes en els bioreactors. Per aquest motiu, les estratègies de cultiu en perfusió són les més adequades, ja que reproduïxen més fidelment les condicions en què es troben les cèl·lules en els organismes pluricel·lulars; és a dir, asseguren el manteniment de concentracions

de precursors i el subministrament constant de nutrients i eliminació de subproductes. De totes maneres, fins i tot en cultius en perfusió, degut a que s'assoleixen densitats molt elevades ($2 \cdot 10^7$ cèl·lules viables·mL⁻¹, per l'hibridoma KB26.5, com es mostra a la Figura 4.1), s'arriba a situacions de limitació d'algun dels nutrients essencials per a la cèl·lula, que engeguen el procés de mort cel·lular que condueix a la pèrdua del cultiu a l'igual que succeeix en cultius en discontinu i discontinu alimentat (veure Figura 1.15).

En cultius en perfusió de cèl·lules d'hibridoma, s'ha observat que el paràmetre que limita la perllongació del procés és l'increment de la concentració de cèl·lules no viables dins els bioreactors (Gàmez, 2000). És a dir, tot i que es manté una determinada concentració cel·lular, les cèl·lules continuen dividint-se però, al no disposar de tots els recursos necessaris per a la correcta proliferació, augmenta el nombre de cèl·lules mortes (Figura 4.1). Això altera les propietats reològiques del medi (es dificulta l'aeració, s'obtura el mòdul de microfiltració, etc.) i s'arriba a un punt a partir del qual no és possible operar durant més temps.

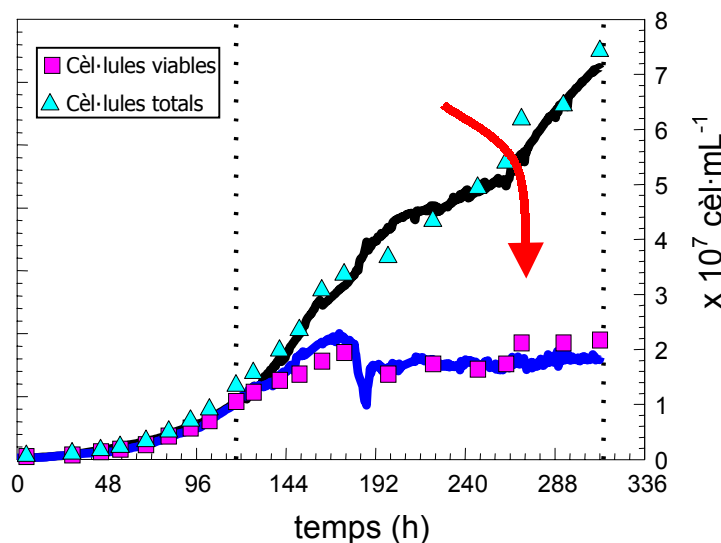


Figura 4.1. Evolució del nombre de cèl·lules viables i no viables en un cultiu d'hibridoma KB26.5 en perfusió. S'observa un elevat increment del nombre de cèl·lules mortes degut a la ràpida velocitat de divisió cel·lular que mostren els hibridomes (Gàmez, 2000). L'objectiu d'aquest apartat del treball de tesi és l'alentiment de la velocitat de divisió cel·lular, de manera que les situacions d'exhauriment de nutrients no es donin o bé arribin més tard, evitant així l'acumulació de cèl·lules mortes dins el bioreactor.

És imprescindible, doncs, reduir el nombre de cèl·lules mortes tot mantenint la densitat de viables. Aquí és on rau l'interès en treballar amb cultius que es trobin en una fase d'aturada del creixement, de manera que la cèl·lula dediqui tots els seus recursos a la producció de la proteïna d'interès i no a la divisió cel·lular (Fussenegger i Bailey, 1998). D'entre els factors inductors de l'apoptosi mostrats al Capítol 1, l'eliminació del sèrum en el medi de cultiu ens mostrava una forma d'aturar el creixement cel·lular si bé, com s'ha dit, aquest és un factor inductor de l'apoptosi. Això fa factible plantejar la possibilitat de modificar la composició del medi amb la finalitat de definir condicions que permetin aturar o alentir el cicle cel·lular dels hibridomes.

Així, s'aconseguiria evitar la desmesurada consumpció de nutrients que comporta la pèrdua del cultiu per una proliferació cel·lular continuada que condueix a limitacions físiques de subministrament de nutrients en algun moment del bioprocés.

Es fa necessari conèixer, doncs, les condicions que permetin alentir el creixement, provocant el desviament dels recursos que sovint empren les cèl·lules en la seva divisió cel·lular per invertir-los en el manteniment de la viabilitat i la producció d'anticòs sense, idealment, engegar la PCD.

En general, dins el bioreactor, les cèl·lules poden trobar-se en tres estats diferents: en procés de divisió i/o diferenciació cel·lular; en un estadi estacionari anomenat G_0 ; o bé en una etapa terminal on s'executa la mort cel·lular per apoptosi. El progrés entre cadascun d'aquests tres estats es troba lligat a un complex entramat de processos bioquímics (Evan i Littlewood, 1998).

Per això, és important conèixer els mecanismes cel·lulars que regulen el procés durant el qual les cèl·lules creixen i es divideixen. El funcionament d'aquest cicle cel·lular és regulat per senyals que indiquen a la cèl·lula quan es donen les condicions adequades per iniciar la seva divisió. Aquests senyals poden provenir de l'entorn extracel·lular (disponibilitat de nutrients i presència de factors de creixement o hormones) o de processos de control intracel·lulars (grandària de la cèl·lula, estat del DNA o dels diferents orgànuls cel·lulars). Quan algun d'aquests senyals indica la presència d'alguna irregularitat, el cicle cel·lular s'interromp fins que la deficiència pugui ser suplida o arreglada. Ara bé, si aquesta irregularitat és molt greu, com podria ser un dany irreparable del DNA, l'aturada del cicle cel·lular és irreversible i la cèl·lula inicia llavors el seu programa apoptòtic. Per altra banda, les cèl·lules que es troben en l'estat estacionari G_0 poden entrar en el cicle cel·lular per l'acció de diferents estímuls extracel·lulars (Fussenegger i Bailey, 1998).

El cicle cel·lular es pot dividir en quatre fases fonamentals: G_1 , S, G_2 i M. Durant la fase G_1 , la cèl·lula acumula suficients metabòlits i prepara tota la seva maquinària per realitzar la replicació del DNA. També és durant la fase G_1 quan les cèl·lules poden iniciar el procés de diferenciació. En la fase S, es dona la duplicació del DNA. La fase G_2 permet a la cèl·lula preparar-se pel procés de divisió cel·lular, que es duu finalment a terme durant la fase M, o mitosi. Després de dividir-se, les cèl·lules poden tornar a iniciar el cicle cel·lular a la fase G_1 o entrar a la fase G_0 , de quiescència. La correcta seqüenciació de cadascuna d'aquestes fases està perfectament regulada per la presència de diferents nivells de determinades proteïnes. Aquestes proteïnes són, com es

mostra a la Figura 4.2, les Cdk (*Cyclin D*ependent *K*inases) i les ciclines, que són subunitats reguladores de l'activitat de les proteïnes Cdk (Morgan, 1995).

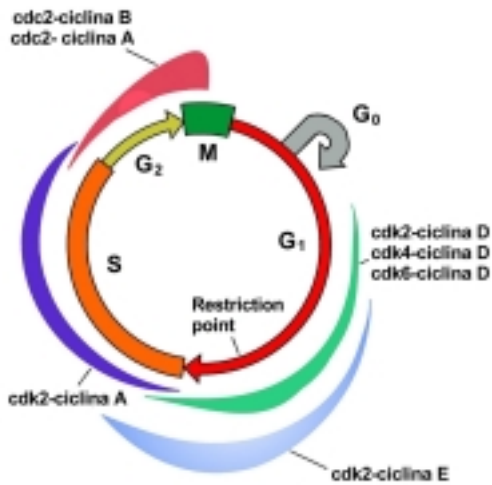


Figura 4.2. Esquema de les diferents fases del cicle cel·lular. S'hi indica també els principals dímers Cdk-ciclina que es formen en cadascuna de les fases. La unió d'una ciclina a una proteïna Cdk activa l'activitat quinasa d'aquesta. La proteïna Cdk activada pot fosforilar i, conseqüentment, activar diferents substrats implicats en la progressió del cicle cel·lular. Els principals dímers que es formen durant el transcurs del cicle cel·lular són Cdk2, Cdk4 i Cdk6 amb les ciclines D1, D2 i D3, respectivament, durant la fase G₁; Cdk2 i ciclina E durant la transició de G₁ a la fase S; Cdk2 i ciclina A durant la fase S; Cdc2 (també anomenada Cdk1) i ciclina A per passar de G₂ a la fase M, i Cdc2 i ciclina B durant les diferents etapes de la fase M (profase, metafase, anafase i tel·lofase) (Nigg, 1995).

A la Figura 4.3, es mostren els resultats obtinguts en les anàlisis de cicle cel·lular d'un cultiu d'hibridoma KB26.5 en la fase exponencial de creixement. S'hi observa l'elevat nombre de cèl·lules que estan duplicant el seu material genètic i preparant-se per a la divisió. Això és degut a que són cèl·lules tumorals que es divideixen contínuament dins el bioreactor en les condicions de cultiu. Aquesta característica, lluny de ser profitosa per al procés de producció, és un dels principals inconvenients en el cultiu d'hibridomes. L'alentiment del seu cicle cel·lular pot assolir-se, com es demostrarà més endavant, per reformulació del medi de cultiu, encara que també pot realitzar-se per modificació genètica.

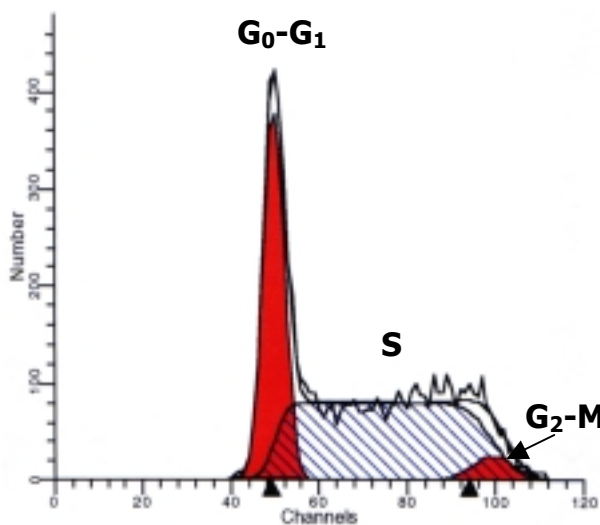


Figura 4.3. Anàlisi per citometria de flux i tinció amb iodur de propidi d'una mostra de cèl·lules d'hibridoma KB26.5 cultivades en medi DMEM complet 4% FCS en la fase exponencial de creixement. S'observa un elevat nombre de cèl·lules que es troben en la fase S de duplicació del DNA, 60.5%, degut a la naturalesa tumoral d'aquestes cèl·lules que es caracteritzen per patir una desregulació en el control de la proliferació cel·lular que es tradueix en aquest elevadíssim nombre de cèl·lules que es divideixen enlloc de romandre en la fase G₀-G₁ (34.9%). Es pot apreciar també el pic corresponent a les cèl·lules que es troben en G₂-M (4.6%).

Durant el cicle cel·lular, la concentració de proteïnes Cdk es manté pràcticament constant. Per contra, la concentració de ciclines pot variar de manera dràstica mitjançant la regulació dels seus processos de transcripció i traducció (Sher, 1994; Morgan, 1995), o bé per la proteòlisi per part d'un complex multiproteic anomenat *proteosoma*, que s'encarrega de degradar les ciclines una vegada realitzada la seva funció, permetent així la formació de nous dímers i, per tant, la progressió del cicle cel·lular (Glotzer et al., 1991). Ara bé, existeixen d'altres nivells de regulació, com són:

- La fosforilació/defosforilació de residus Thr o Tyr de les Cdk pot activar/inhibir la seva funció mitjançant la quinasa CAK (*Cdk-Activating-Kinase*) i la fosfatasa CDC25 (Fischer et al., 1995; Galaktionov et al., 1995).
- Acció de les Cdkis (*Cdk inhibitors*), que tenen un domini que interacciona amb les quinases Cdk o els dímers Cdk-ciclina, inhibint la seva acció catalítica (Peter i Herskowitz, 1994). N'hi ha de molt específiques, com són p15, p16, p18 i p19 (Hirai et al., 1995; Sher i Robert, 1995), i d'inespecífiques, com p21, p27 i p57, que poden actuar sobre qualsevol dímer Cdk-ciclina i aturar així el cicle cel·lular en qualsevol de les seves fases (Toyoshima i Hunter, 1994; Harper et al., 1995).
- Interacció de factors de creixement mitogènics (EGF, PDGF, FGFs i diferents citoquines) o anti-mitogènics (TGF- β) amb receptors de la membrana plasmàtica (Pardee, 1989; Ewen et al., 1993; Collins et al., 1994). Aquests senyals extracel·lulars únicament afecten els dímers Cdk-ciclina presents a l'inici de la fase G₁, per això la cèl·lula només respon a ells durant aquest curt interval, abans d'ultrapassar el punt del cicle cel·lular anomenat R (*Restriction point*) (Bartek et al., 1996).

Sembla ser que, a partir del punt R, el pas cap a la fase M es dona gairebé de forma irreversible (Murray, 1992). La proteïna que regula la progressió del cicle cel·lular a través d'aquest punt de control s'anomena pRB (*Retinoblastoma protein*) (Weinberg, 1995), la qual, en estat no fosforilat, impedeix traspasar el punt R, i és solament després de ser fosforilada que perd la seva capacitat d'inhibició, permetent així la progressió del cicle cel·lular. La pRB és fosforilada pels complexos Cdk-ciclina presents a la fase G₁ (Hinds et al., 1992). L'existència de mutacions en la seqüència del gen *Rb* o la sobreexpressió d'alguna de les seves múltiples proteïnes reguladores,

pot induir una activitat pRB constitutiva que és la responsable d'un gran nombre de casos de càncer (Horowitz et al., 1990; Hirama i Koeffler, 1995).

Precisament, el punt R està fortament relacionat amb un darrer mecanisme que té la cèl·lula per controlar la progressió del cycle cel·lular: la presència de diferents senyals intracel·lulars, com el nivell de recursos energètics existents o la integritat del material genètic, que permeten establir en quin estat intern es troba la cèl·lula. Aquesta autoavaluació determina si la cèl·lula passa el punt R i acaba culminant el cycle cel·lular, si surt del cycle cel·lular abans del punt R i entra en la fase G₀ o en un estat de diferenciació, o bé si s'atura el cycle cel·lular i s'inicia el programa de mort per apoptosi (Evan i Littlewood, 1998).

Del complex mecanisme que permet a la cèl·lula avaluar el seu estat intern, es coneix el responsable de la resposta a aquests senyals: la proteïna p53, que pot respondre a certs senyals intracel·lulars que indiquen la presència d'errades o danys en el DNA, o l'existència de desajustaments metabòlics, com per exemple situacions d'anòxia (Kastan et al., 1991; Lane, 1992; Graeber et al., 1996; Woo et al., 1998). Si l'aturada del cycle cel·lular es dona abans de passar el punt R i l'alteració cel·lular no és gaire greu, la cèl·lula disposa d'un cert període de temps per corregir-la i, a continuació, seguir la seva progressió cap a la fase S (Gao i Zelenka, 1997).

Per contra, si l'alteració s'ha donat després del punt R o s'ha detectat la presència de danys cel·lulars extremadament greus, p53 actua sobre p21 induint una parada irreversible del cycle cel·lular i, endemés, indueix l'inici de l'apoptosi mitjançant la regulació de la transcripció de determinats gens (Pellegata et al., 1996; Sakamuro et al., 1997; Gervais et al., 1998). La seva acció proapoptòtica es dona sobreexpressant el gen que codifica per la proteïna Bax i reprimint l'expressió del protooncogen Bcl-2, d'aquesta manera contribueix a la inducció de l'apoptosi a través de la via mitocondrial, també anomenada intrínseca (Evan i Littlewood, 1998, Reed i Paternostro, 1999).

L'estratègia genètica d'alentiment del cycle cel·lular emprada per diversos autors en línies cel·lulars d'interès biotecnològic a escala de cultiu en bioreactor mitjançant diferents metodologies com la sobreexpressió de p21, una proteïna inhibidora inespecífica dels complexos Cdk-ciclina que es mostraven a la Figura 4.1 (El-Deiry et al., 1993; Fussenegger et al., 1998; Mazur et al., 1998a i b).

De totes maneres, les estratègies genètiques d'aturada del cicle cel·lular presenten un seguit d'inconvenients com és la pèrdua de l'estabilitat dels missatges clonats al llarg del temps i no han estat implementades en cultius a gran escala en processos de llarga durada. Per això, en aquest treball s'explora la reformulació del medi de cultiu com a forma barata i simple d'alentir el cicle cel·lular de l'hibridoma KB26.5.

En cultius en perfusió de cèl·lules CHO s'ha observat que canviant la font de carboni es pot induir una aturada del cicle cel·lular en la fase G_1 (Altamirano, 2000) i aquest precedent serveix per, en aquest treball, plantejar la possibilitat d'assolir un estat citostàtic en els hibridomes. Per això, s'han avaluat diferents situacions que permetin inhibir la divisió cel·lular i estudiar l'activació de la mort per apoptosi de les cèl·lules amb l'objectiu d'implementar la millor de les condicions en un sistema de cultiu en perfusió bifàsica, on hi hauria una primera fase de creixement, seguida d'un canvi de medi que permetés l'aturada de la divisió cel·lular sense induir l'activació de la mort de l'hibridoma.

4.2. Estratègies per a l'aturada del cicle cel·lular en l'hibridoma KB26.5

Com s'ha esmentat anteriorment, un dels principals inconvenients que trobem en el cultiu d'hibridomes és el desmesurat consum de nutrients que, lluny de ser emprats eficientment per a la divisió cel·lular i la producció d'anticòs, condueix a l'acumulació de subproductes del metabolisme, com el lactat i l'amoni que, a partir de determinades concentracions, poden ser tòxics a les pròpies cèl·lules (Paredes et al., 1998). Per aquest motiu, la possibilitat d'aturar el creixement cel·lular tot mantenint la producció d'anticòs és d'especial interès en el nostre treball amb hibridomes.

Se sap que, com a resposta a una alteració en el medi de cultiu, es pot produir una aturada del cicle cel·lular en G_1 (Fussenegger i Bailey, 1998). És a dir, a les cèl·lules els caldrà més temps per acumular els metabolits necessaris per a la duplicació del material genètic i, d'aquesta manera, hi haurà una major proporció de cèl·lules en la fase G_1 . Això portarà a que es posin en marxa uns mecanismes que, o bé activaran la mort cel·lular, o bé mantindran una velocitat lenta de divisió cel·lular.

Linardos i col·laboradors, 1992, han analitzat la influència de la velocitat de dilució sobre el creixement i la mort cel·lular en el cas de cultius d'hibridoma des d'una perspectiva que considera la fracció de cèl·lules segrestades en la fase G_1 del cicle cel·lular. Una de les seves troballes ha estat que a velocitats de creixement més altes, on la fracció de cèl·lules en G_1 és més petita, la taxa de mort cel·lular és més baixa. Així doncs, conclouen, que hi ha una relació de dependència positiva entre la fracció de cèl·lules en G_1 i la taxa de mort cel·lular.

Sense contradir això, però centrant-se en un ventall més ample de casos, Fussenegger i Bailey, 1998, han copsat que hi ha substàncies que provoquen una aturada del cicle cel·lular en G_1 , però la seva citotoxicitat impedeix perllongar la durada dels cultius. D'altra banda, hi ha compostos químics que permeten aturar el cicle cel·lular sense que s'activin els programes de mort cel·lular. Una d'aquestes substàncies és el butirat sòdic, del que es postula que indueix una sobreproducció de p21, proteïna reguladora del cicle cel·lular en cèl·lules de mamífer que interacciona amb les ciclina E-CDK2 kinases i les inhibeix, evitant l'entrada de les cèl·lules en la fase S.

Depenent de la naturalesa de les cèl·lules, el seu comportament respecte el cicle cel·lular és diferent. Així les cèl·lules neuronals, un cop han assolit la diferenciació durant el desenvolupament embrionari, es mantenen fora del cicle de divisió cel·lular, és a dir, en la fase G_0 . En canvi, les cèl·lules d'hibridoma, degut a la seva naturalesa tumoral, es trobaran contínuament dins el cicle de divisió cel·lular, sense entrar en G_0 en cap moment.

En aquest capítol, es presenten els resultats de l'anàlisi que es va fer a partir de tres tipus de modificació del medi de cultiu:

- **SUBSTITUCIÓ DE COMPONENTS DEL MEDI:** Es va substituir la principal font de carboni (glucosa) per altres que són metabolitzades a velocitat més lentes (galactosa, manosa i fructosa).
- **REDUCCIÓ/SUPRESSIÓ DE COMPONENTS DEL MEDI:** Es van disminuir les concentracions de sèrum, fosfats, vitamines; i es van realitzar experiments amb medis mancats d'aminoàcids no essencials (Ser, Gly, Cys, Tyr).
- **ADDICIÓ DE COMPONENTS AL MEDI:** Es va addicionar NH_4Cl i hidroxieuera.

Aquests experiments es van plantejar considerant la composició del medi de cultiu emprat per a l'hibridoma KB26.5 (DMEM) i referències bibliogràfiques que, encara que en molts casos els estudis no anaven dirigits a alentir el cicle cel·lular, aquest efecte havia estat observat. Així, Hauser i Wagner, 1997, van canviar la font principal de carboni per fructosa, galactosa o manosa amb l'objectiu de disminuir la producció de subproductes tòxics però van observar una aturada del cicle cel·lular. Els altres treballs considerats són:

- Reducció de la concentració de fosfats (Seifert i Phillips, 1999), sèrum (Caple et al., 1991; Seifert i Phillips, 1999) i d'oxigen (Demangel et al., 1991)
- Disminució del pH (Kimura i Miller, 1996; McQueen i Bailey, 1991)
- Variació de la temperatura (Passini i Gouchee, 1989; Sureshkumar i Mutharasan, 1991; Bloemkolk et al., 1992; Borth et al., 1992; Barnabé i Butler, 1994)
- Addició d'hidroxiurea (Suzuki i Ollis, 1990), acetat potàssic (Suzuki i Ollis, 1990), i butirat sòdic (Fusseneger i Bailey, 1998).

Les darreres opcions suposen l'addició de substàncies químiques, de les quals un gran nombre han mostrat tenir efecte en la inducció de l'aturada del cicle cel·lular, si bé la majoria d'elles no són aplicables en produccions a gran escala, degut al seu cost elevat.

Com s'ha explicat des de la Introducció d'aquest treball, l'exhauriment de la glutamina en el medi és el principal factor limitant del creixement en el cultiu d'hibridomes i és, al mateix temps, el principal factor inductor de la mort per apoptosi. Així, l'èxit o fracàs en l'alentiment del cicle cel·lular de l'hibridoma KB26.5 en els experiments que es mostren en els subapartats següents ha de ser valorat respecte un control positiu i negatiu que es defineix a continuació.

Sabem que la presència de tots els components requerits per l'hibridoma en el medi assegura el creixement exponencial dels cultius i permet una situació de constant divisió cel·lular. Per contra, la manca de glutamina provoca l'aturada del cicle cel·lular en la fase G_1 (Tintó, 1999), segurament perquè la cèl·lula no pot realitzar, en aquestes condicions, processos d'obtenció d'energia a nivell de la glucòlisi, o bé la síntesi d'àcids nucleics i proteïnes, impossibilitant així la replicació del seu material genètic (Evan i Littlewood, 1998). Això comporta la immediata activació dels mecanismes de mort per apoptosi de la cèl·lula i la viabilitat del cultiu disminueix dràsticament (Figura 4.4).

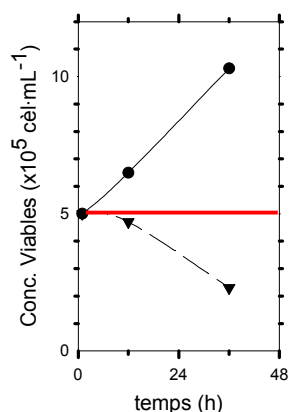


Figura 4.4. Efecte de la presència i absència de la glutamina en els cultius d'hibridoma KB26.5. Evolució de la concentració de cèl·lules viables en un cultiu en medi DMEM 2% FCS amb glucosa 25 mM, glutamina 6 mM i condicions aeròbies (●); i cultiu en medi DMEM 2% FCS amb glucosa 25 mM, sense glutamina i condicions aeròbies (▼). Les cèl·lules van ser cultivades en flascons amb 10 mL del medi corresponent amb un inòcul de 5.0×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹. A les 36 hores de cultiu, es van prendre mostres i es va determinar el nombre de cèl·lules apoptòtiques per microscòpia de fluorescència. Així, la disminució del nombre de cèl·lules viables observada en aquesta figura s'explica per un increment en el nombre de cèl·lules apoptòtiques (un 61% en el cultiu mancat de glutamina respecte el 9% en el cultiu en medi complet). En vermell, es representa la situació ideal que es proposa en aquest apartat del treball. Es pretén trobar unes condicions de cultiu que assegurin el manteniment de la viabilitat sense comportar un increment del nombre de cèl·lules mortes.

Així doncs, es va prendre la presència i l'absència de glutamina com a controls positiu i negatiu, respectivament, d'aquests experiments. Per tant, l'objectiu d'aquesta part del treball fou determinar quina situació permetia que ni augmentés ni disminuís el nombre de cèl·lules viables i això sense que s'incrementi la concentració de cèl·lules mortes.

Degut a l'elevat nombre de possibles substàncies amb capacitat d'aturar o alentir el cicle cel·lular que es volia analitzar, es van realitzar experiments preliminars en plaques de sis pous amb 2 mL de medi per determinar quines d'elles permetien assolir l'objectiu d'alentir el cicle cel·lular, tot mantenint la densitat de cèl·lules viables. Aquests resultats es presenten a la Figura 4.5, i es comenten a continuació:

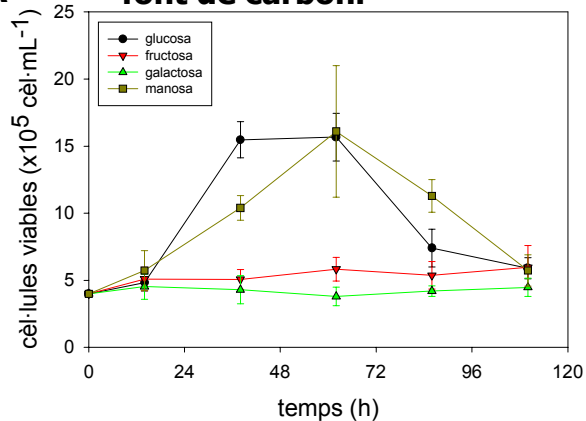
- **CANVI DE LA PRINCIPAL FONT DE CARBONI:** La galactosa, fructosa i, sobretot la glucosa, són les fonts de carboni utilitzades per al cultiu de cèl·lules animals. La glucosa entra a la ruta de la glucòlisi a una velocitat molt elevada, mentre que el transportador d'entrada a la cèl·lula, l'hexoquinasa, presenta una afinitat unes 20 vegades menor tant per la galactosa com per la fructosa, convertint-les en fonts de carboni lentament metabolitzables (Hauser i Wagner, 1997). Els experiments realitzats amb medis on la font de carboni era glucosa, o fructosa, o galactosa, o bé manosa, s'aprecia que la línia cel·lular d'hibridoma utilitzada com a model en aquest treball pot créixer a una velocitat elevada tant amb glucosa com manosa, mentre que amb fructosa i amb galactosa la concentració de cèl·lules viables es manté estable durant la realització dels cultius (Figura 4.5A). No obstant això, l'acumulació de cèl·lules mortes s'incrementa notablement a partir de les 72 hores de cultiu (Figura 4.5B).
- **REDUCCIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE SÈRUM:** La reducció de la concentració de sèrum és d'especial interès en l'abaratiment del preu del medi de cultiu i també facilita

la purificació del producte obtingut. La manca d'aquest component del medi, ric en factors de creixement i mitògens hauria de tenir un efecte directe sobre el cicle cel·lular (Freshney, 1986). Això s'observa en la Figura 4.5C, on la reducció del percentatge de sèrum del 4% (condicions habituals de cultiu de l'hibridoma KB26.5) a la supressió total provoca una reducció de la velocitat de creixement, essent també significativa la reducció de l'increment del nombre de cèl·lules mortes (Figura 4.5D), encara que el nombre de cèl·lules no viables augmenta lleugerament a partir de les 48 hores de cultiu.

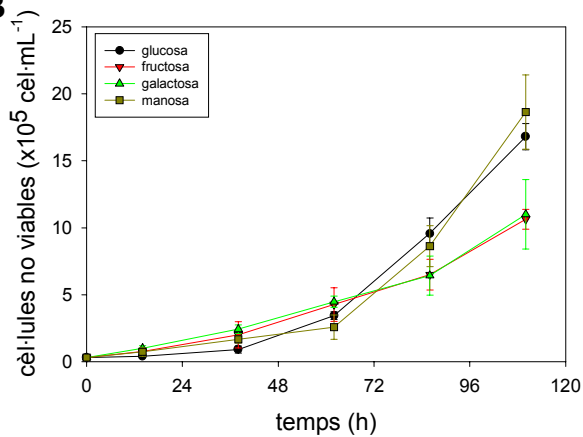
- **REDUCCIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE FOSFATS:** Els fosfats, que són constituents dels nucleòtids, també actuen com a transportadors d'energia química, especialment d'ATP, participant en la transferència d'energia en les reaccions cel·lulars. Així, la seva reducció en el medi de cultiu provoca una limitació energètica i de les subunitats que conformen els àcids nucleics. Inicialment (Figura 4.5E), hi ha un lleuger increment de la densitat cel·lular en totes les concentracions provades (0.109, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0 g·L⁻¹) però, a continuació, degut a la limitació de fosfats en el medi, només en el cultiu que no conté fosfats al medi és possible aturar el creixement cel·lular. El nombre de cèl·lules mortes augmenta notablement entre les 48 i les 72 hores de cultiu (Figura 4.5F).

Figura 4.5 (pàgines següents). Resultats obtinguts en l'estudi preliminar de substitució i addició de molècules susceptibles d'interferir en la maquinària de divisió cel·lular. Els experiments que es mostren són: substitució de la font de carboni, reducció de la concentració de sèrum, reducció de la concentració de fosfats, supressió dels aminoàcids no essencials, reducció de la concentració de vitamines, addició d'amoni, addició d'hidroxiurea, i supressió del ferro. Les gràfiques A, C, E, G, I, K, M, i O, mostren l'evolució de la concentració de cèl·lules viables. Les gràfiques B, D, F, H, J, L, N, i P, mostren l'evolució de la concentració de cèl·lules no viables. En cada cas, es mostra el cultiu control positiu respecte realitzat en medis que contenen tots les components del medi emprats habitualment però s'obvia el control negatiu que, com s'ha explicat anteriorment en el text es va realitzar suprimint totalment la glutamina de la formulació del medi de cultiu.

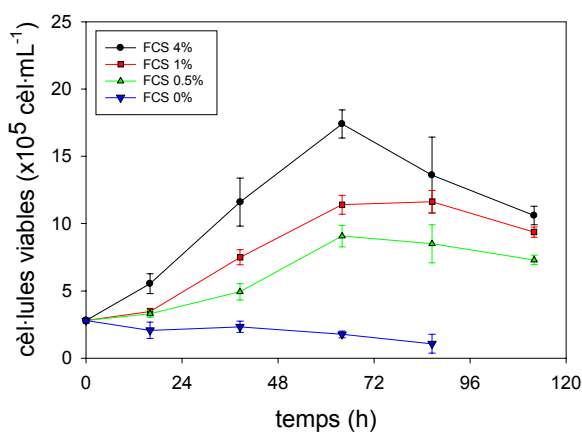
A font de carboni



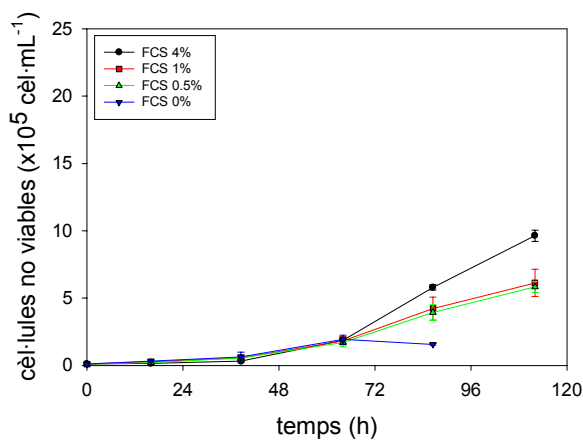
B



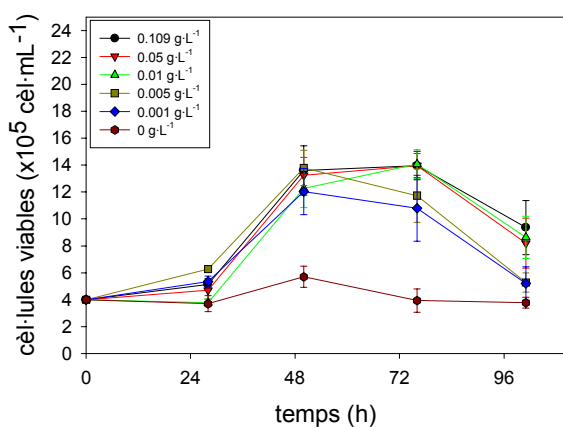
C sèrum



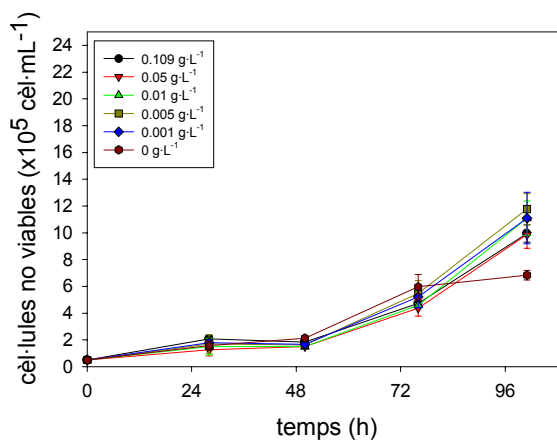
D



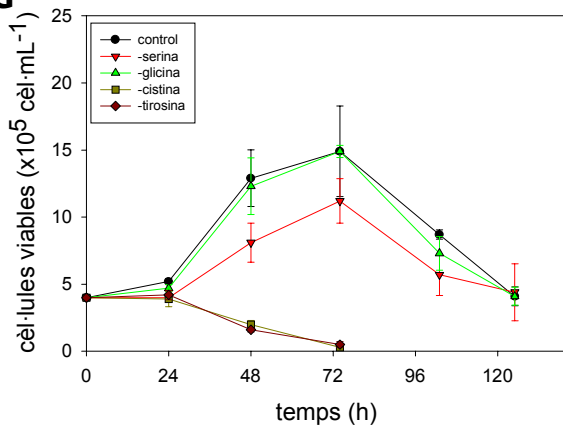
E fosfats



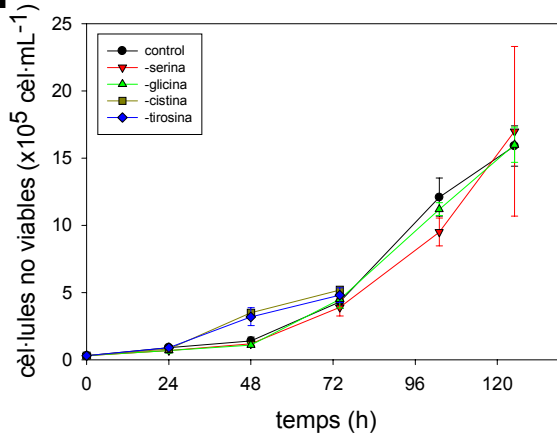
F

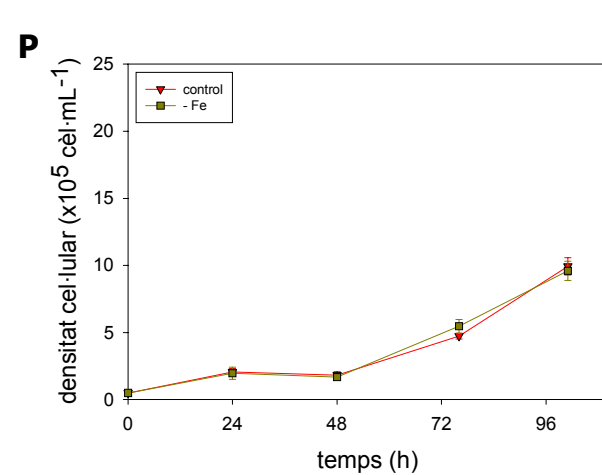
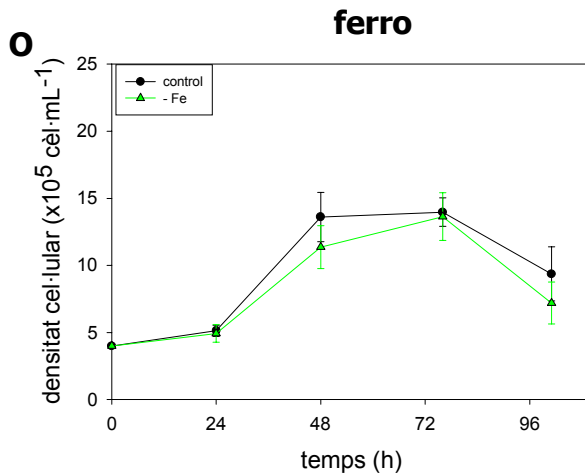
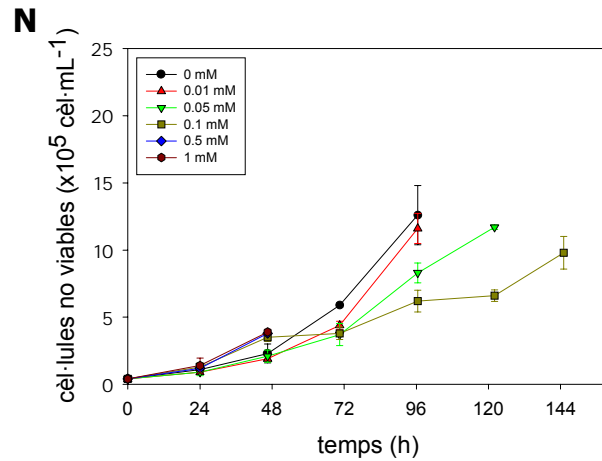
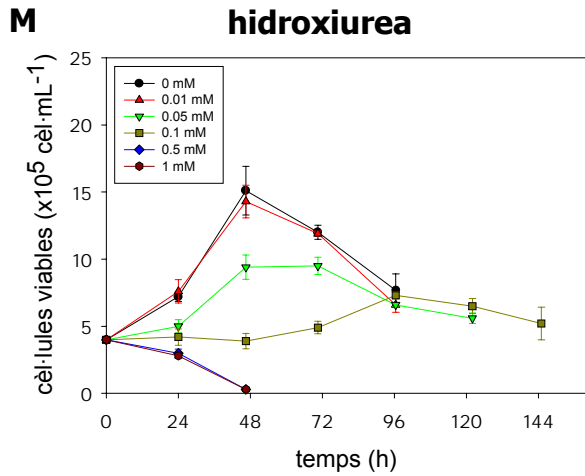
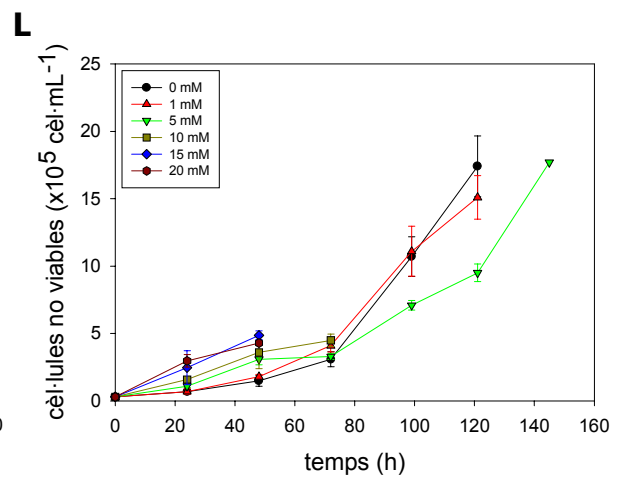
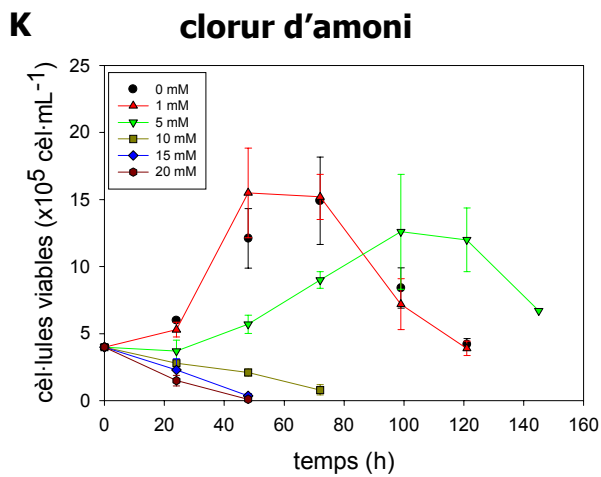
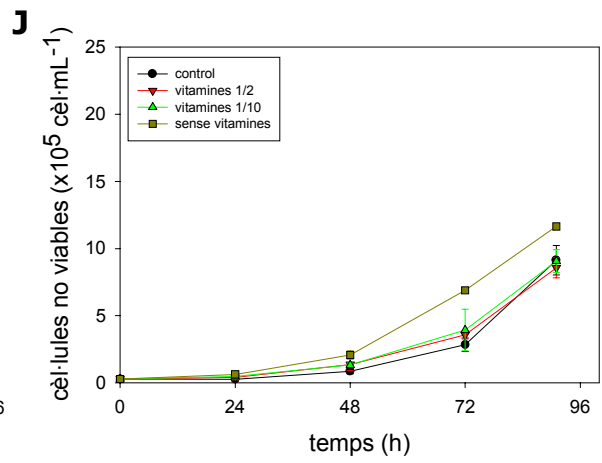
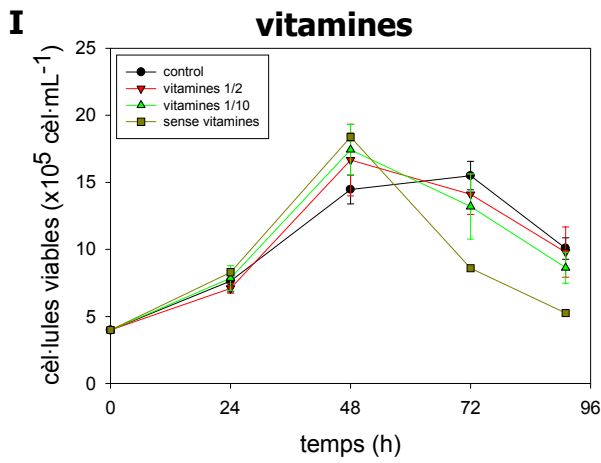


G aminoàcids



H





- **SUPRESSIÓ DELS AMINOÀCIDS NO ESSENCIALS:** En aquest experiment, es van suprimir els aminoàcids presents en el medi que poden ser sintetitzats a partir d'altres, tot augmentant la concentració dels seus precursors per compensar-ne el consum addicional. En aquest experiment es pretén crear un coll d'ampolla en la seva síntesi que alenteixi la velocitat de creixement de l'hibridoma. En aquest cas, s'han fet experiments eliminant del medi de cultiu els aminoàcids: serina, glicina, cistina, i tirosina. La cisteïna pot ser sintetitzada a partir de la metionina i la serina, i la glicina pot ser sintetitzada a partir de la serina i té un paper important com a precursor de nucleòtids (Lehninger et al., 1993; Sanfeliu et al., 1996). D'altra banda, la tirosina pot ser sintetitzada a partir de la fenilalanina (Lehninger et al., 1993) i, com s'ha esmentat abans, la serina és precursora de la glicina i la cisteïna, i pot ser sintetitzada a partir de 3-fosfoglicerat, que és producte intermediari de la glucòlisi (Lehninger et al., 1993). Tant en el cas de la supressió de cisteïna com de tirosina (Figura 4.5G), dóna la impressió que o bé la cèl·lula no pot sintetitzar aquests aminoàcids o bé ho fa molt lentament, ja que la pèrdua de viabilitat del cultiu és molt ràpida (Figura 4.5H). Pel que fa la supressió de la glicina en el medi, no s'observa pràcticament cap canvi en el comportament respecte el control que conté tots els aminoàcids en la seva formulació. En el cas de la serina, s'observa que la cèl·lula sembla tenir la capacitat per sintetitzar-la a una velocitat que permet el creixement del cultiu si bé aquest és significativament inferior al del control. De totes maneres, amb les dades de què disposem no es pot concloure que hi hagi cap reducció en l'increment de cèl·lules mortes.
- **REDUCCIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE VITAMINES:** Tot i que les vitamines no són fonts de carboni, nitrogen o energia, són essencials per a la transformació de l'energia i regulació del metabolisme. Per aquest motiu, una manca de vitamines pot produir dèficits metabòlics. S'han realitzat experiments amb la concentració de vitamines original del medi DMEM i sense vitamines. Entre aquests dos, s'han fet cultius amb concentracions diluïdes 1:2 i 1:10 de l'original. Tal com podem veure en les Figures 4.5I,J, només és significativa la diferència de creixement i proliferació del cultiu sense vitamines que, fins a les 48 hores, presenta un comportament molt similar als altres però, a partir d'aquest moment, es deurién haver esgotat les vitamines que hi havia al citoplasma, ja que la proliferació exponencial de cèl·lules mortes ha començat abans que en els altres cultius.

- **ADDICIÓ DE CLORUR D'AMONI:** L'addició d'aquest compost al medi provoca una reducció del pH del citoplasma. Prèviament a la realització dels experiments, es disposava de dades bibliogràfiques referents a la línia cel·lular d'hibridoma ATCC TIB31 que mostraven un efecte inhibitori en el creixement de concentracions properes a 3 mM (McQueen i Bailey, 1991). Les concentracions provades en aquest experiment van ser: 0, 1, 5, 10, 15 i 20 mM. En el cultiu tractat amb 5 mM NH₄Cl (Figura 4.5K,L), s'observa un efecte inhibitori del creixement, sense haver-hi una toxicitat del compost que indueixi una pèrdua ràpida de viabilitat del cultiu. En aquest cas, la velocitat de creixement del cultiu és considerablement més baixa que la del control. Pel que fa a la velocitat de proliferació de cèl·lules mortes, inicialment sembla que en el cultiu que conté 5 mM NH₄Cl aquesta sigui més gran, fet que a continuació es veu compensat per un retard en l'esgotament del medi, que fa que l'acumulació de cèl·lules mortes no sigui tant ràpida com en el control. En els punts anteriors a l'arribada a un màxim de densitat cel·lular, que és on se suposa que es dona l'esgotament del medi, ja s'observa una velocitat de proliferació de cèl·lules mortes relativament elevada, tot i que inferior en la del control, on el cultiu ja es troba en fase de mort. Finalment, en el cultiu que conté 5 mM NH₄Cl s'arriba a un esgotament del medi aproximadament 4 dies després de l'inici del cultiu. A partir d'aquest punt, la velocitat de mort serà exponencial, equivalent a la del cultiu de control.
- **ADDICIÓ D'HIDROXIUREA:** La hidroxiiurea és un inhibidor del creixement cel·lular per la seva interferència en els mecanismes de síntesi de DNA. Aquesta molècula permet reduir el creixement fins arribar a aturar-lo completament (probablement com a resultat de la seva toxicitat) i millorar la producció específica d'anticòs (Suzuki i Ollis, 1990). En aquest experiment, s'ha treballat amb les següents concentracions d'hidroxiiurea: 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 i 1 mM. A una concentració de 0.05 mM ja es pot observar un efecte de disminució de les velocitats de creixement i de proliferació de cèl·lules mortes, però és a 0.1 mM on l'efecte observat és més fort (Figura 4.5M,N). A concentracions majors d'aquesta, la hidroxiiurea és un compost tòxic pel cultiu. A una concentració de 0.05 mM la velocitat de creixement es redueix lleugerament, respecte a la del control, mentre que la de mort és similar tant en la fase de creixement exponencial com en la fase de mort, ja que tal com passa en el control, es deu haver exhaurit algun nutrient.

- **REDUCCIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE SALS FÈRRIQUES:** El ferro és requerit per la cèl·lula com a part integral de les reaccions biològiques necessàries pel seu propi manteniment. Així, com a component estructural de l'hemoglobina i mioglobina, el ferro juga un paper clau en el transport d'oxigen i en la funció dels citocroms com a transportadors d'electrons en la fosforilació oxidativa. El ferro també és necessari per a les activitats de la polimerasa de RNA i de la ribonucleòtid reductasa, un enzim requerit per a la síntesi de DNA (Stryer, 1995). Com que la concentració de sals fèrriques present en el medi DMEM és molt baixa, només s'han avaluat el creixement del cultiu en dues situacions: en presència de la concentració habitual de sals fèrriques i en absència d'aquestes. No s'han observat canvis significatius en el perfil de creixement ni en l'acumulació de cèl·lules mortes respecte el cultiu control (Figura 4.5O,P).

Pràcticament tots els canvis realitzats en el medi provoquen alguna variació en les corbes de creixement dels cultius, essent generalment aquestes variacions de reducció de la velocitat de creixement i de canvi en la velocitat d'acumulació de cèl·lules mortes.

A partir dels resultats obtinguts, es va estudiar amb més profunditat les condicions que permetien obtenir els millors resultats en l'alentiment del creixement cel·lular: la substitució de la font principal de carboni per fructosa o bé galactosa, i la reducció de la concentració de sèrum i fosfats del medi. En totes tres condicions, es mantenia estable la concentració de cèl·lules viables i, tot i que la velocitat d'acumulació de cèl·lules mortes era lleugerament superior en la zona de creixement exponencial del cultiu control, al llarg del cultiu la velocitat de mort té uns valors que fa pensar en la possibilitat de reduir significativament l'increment de cèl·lules mortes en cultius en perfusió. D'altra banda, també es va escollir aquesta alternativa per la simplicitat que suposa realitzar aquest canvi en la formulació del medi.

Com s'ha explicat en aquest capítol, el cicle cel·lular està constituït per diferents etapes durant les quals la cèl·lula acumula suficients metabolits i prepara la seva maquinària cel·lular per realitzar la replicació del DNA (fase G₁), duplicar el seu DNA (fase S), preparar-se pel procés de divisió cel·lular (fase G₂) i, finalment, dividir-se en dues cèl·lules noves (fase M o mitosi). Per culminar el cicle cel·lular, la cèl·lula ha de replicar el seu DNA, ha de transcriure el seu material genètic en múltiples còpies de diferents mRNAs, ha de traduir tots aquests mRNAs per disposar de les proteïnes necessàries per portar a terme totes les seves funcions cel·lulars, ha de construir

els orgànuls i les estructures cel·lulars que formaran part de la nova cèl·lula i lògicament, ha de sintetitzar energia suficient per poder realitzar totes aquestes activitats anteriorment citades.

Per aquest motiu, és lògic pensar que la manca d'alguns dels principals nutrients del medi de cultiu i com a conseqüència la interrupció d'una o diverses de les vies metabòliques de la cèl·lula, pugui interferir en el funcionament del cicle cel·lular. A més a més, s'ha descrit bibliogràficament que l'aturada del cicle cel·lular pot ser per sí sola una de les causes inductores de l'apoptosi (Evan i Littlewood, 1998). És per això, que es va determinar també, per a cada experiment, el nombre de cèl·lules apoptòtiques per citometria de flux.

4.2.1. Canvi de la principal font de carboni

La galactosa, fructosa i, sobretot la glucosa, són les fonts de carboni més utilitzades en el cultiu de cèl·lules animals. La glucosa entra a la ruta de la glucòlisi a una alta velocitat, mentre que el transportador d'entrada a la cèl·lula, l'hexoquinasa, presenta una afinitat unes 20 vegades menor tant per la galactosa com per la fructosa, portant això a un metabolisme més reduït (Hauser i Wagner, 1997).

Els experiments realitzats amb aquestes fonts de carboni mostren com l'hibridoma KB26.5 manté estable la concentració de cèl·lules viables en medis on s'ha substituït la glucosa per la fructosa o la galactosa. En aquests experiments, es van preparar tres cultius amb diferents formulacions (Taula 4.1): cultiu control amb medi DMEM 4% FCS amb glucosa; cultiu amb medi DMEM 4% FCS sense glucosa i amb fructosa; cultiu amb medi DMEM 4% FCS sense glucosa i amb galactosa. Es van utilitzar 30 mL de cadascun dels medis per a cada cultiu amb un inòcul de 3.0×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹.

A la Figura 4.6, es mostren els resultats obtinguts en aquest experiment d'alentiment del cicle cel·lular per canvi de la font carboni.

cultiu DMEM 4% FCS font de carboni

control	+	+	glucosa
1	+	+	fructosa
2	+	+	galactosa

Taula 4.1. Quadre resum dels cultius realitzats en els experiments d'estudi de l'alentiment del cicle cel·lular per canvi de font de carboni

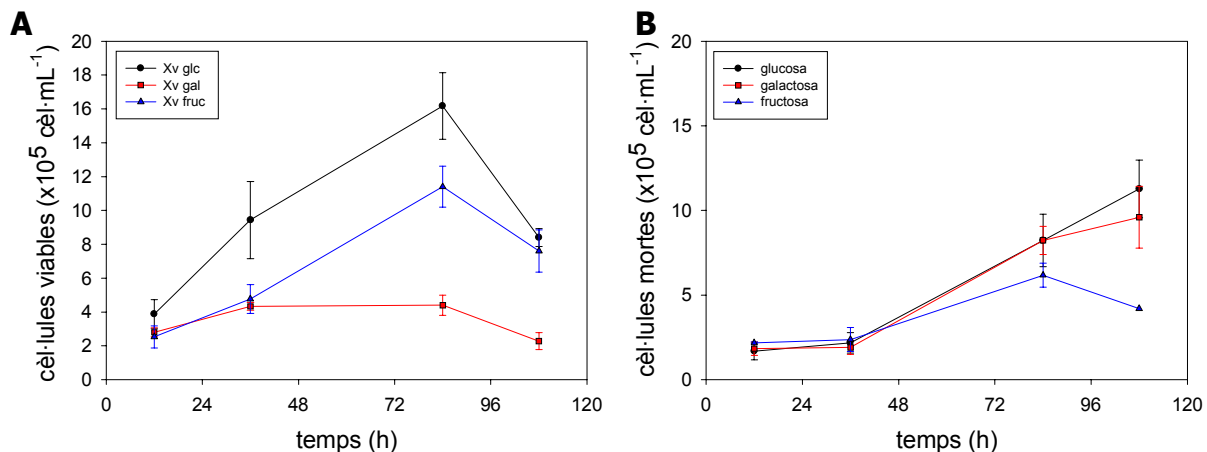


Figura 4.6. Efecte del canvi de la font de carboni en la viabilitat dels híbridomes. Evolució de la concentració de cèl·lules viables (A) i de cèl·lules no viables (B) en cultius amb diferents fonts de carboni.

De bon començament, els cultius amb fructosa i galactosa presentaven una velocitat de mort lleugerament superior a la del control amb glucosa, tot i mantenir-se en valors baixos. A més a més, entre les 86 i les 110 hores, aquesta velocitat de mort augmentava lleugerament, aproximant-se més a la velocitat de mort del cultiu de control (excepte pels cultius amb fructosa, que oferien un valor lleugerament inferior de cèl·lules mortes a les 86 hores).

Aquest augment en la taxa de mort dels cultius amb fructosa i galactosa es pot explicar per la naturalesa del cycle cel·lular: quan el cultiu sofreix algun canvi en el medi que implica una reducció en la velocitat de creixement i, per tant, una major proporció de cèl·lules en fase G_1 , és d'esperar que una part de la població cel·lular no superi els punts de control que comproven el bon funcionament cel·lular i activin el seu programa de mort per apoptosi.

Per comprovar això, es van prendre mostres en el moment en que augmentava el nombre de cèl·lules mortes en els cultius, aproximadament 72 hores després d'haver-se iniciat l'experiment, i es va determinar mitjançant tinció amb Annexina el nombre de cèl·lules que havien externalitzat la fosfatidilserina, com a indicació del nombre de cèl·lules mortes per apoptosi així com el percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cycle cel·lular (Taula 4.2)

Els resultats dels experiments de cycle cel·lular mostren uns valors similars entre el nombre de cèl·lules que es troben en cada fase del cycle en els tres cultius encara que, com mostra la Taula 4.2, el canvi de la font de carboni indueix un augment dràstic de la mort per apoptosi, segurament a conseqüència de la interrupció dels processos que permeten l'obtenció de l'energia i els precursors necessaris per duplicar el material genètic i generar una nova cèl·lula.

	Annexina-positives (%)	Cicle Cel·lular (%)		
		G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
control positiu	51.8 ± 6.3	34.8	60.3	4.9
fructosa	67.6 ± 10.8	39.5	58.3	2.2
galactosa	78.5 ± 8.5	28.9	65.9	5.2

Taula 4.2. Resultats obtinguts en els estudis d'apoptosi i de cicle cel·lular. Es mostra el percentatge de cèl·lules que presenten la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana citoplasmàtica (per tinció amb Annexina-V-fluos); i els resultats de cicle cel·lular obtinguts per tinció amb iodur de propidi i detecció per citometria de flux.

Així, si bé el nombre de cèl·lules viables es manté relativament constant al llarg del temps, aquest canvi de font de carboni no és una bona alternativa per ser aplicada en cultius en perfusió bifàsica, a menys que no es trobi la manera d'evitar l'activació de la mort per apoptosi de les cèl·lules que no poden tirar endavant el cicle cel·lular.

4.2.2. Reducció de la concentració de sèrum

Diferents estudis realitzats mostren, d'una banda, que la producció d'anticòs es manté durant un període perllongat de temps davant d'una reducció en la concentració de sèrum (Seifert i Phillips, 1999) i, d'altra banda, que la concentració de proteïna en el medi òptim per a producció d'anticòssos és menor que en els medis utilitzats habitualment (Caple et al., 1991).

El punt de partida de l'experiment va ser una concentració d'un 4% (v/v) de sèrum fetal de vedella, que és la concentració habitual de cultiu de l'hibridoma KB26.5, que es va rebaixar gradualment fins suprimir-lo totalment del medi.

En aquests experiments, es van preparar quatre cultius amb diferents formulacions (Taula 4.4): cultiu control amb medi complet DMEM 4% FCS; cultiu amb medi complet DMEM 1% FCS; cultiu amb medi complet DMEM 0.5% FCS; i cultiu amb medi complet DMEM 0% FCS. Es van utilitzar 30 mL de cadascun dels medis per a cada cultiu amb un inòcul de 3.0×10^5 cèl·lules viables·mL⁻¹.

A la Figura 4.7, es mostra com la reducció del percentatge de sèrum present en el medi provoca la reducció de la velocitat de creixement, essent també significativa la disminució de l'increment de cèl·lules mortes.

cultiu	DMEM	FCS
control positiu	+	4 %
1	+	1 %
2	+	0.5 %
3	+	0 %

Taula 4.3. Quadre resum dels cultius realitzats en els experiments d'estudi de l'alentiment del cycle cel·lular per reducció de concentració de sèrum.

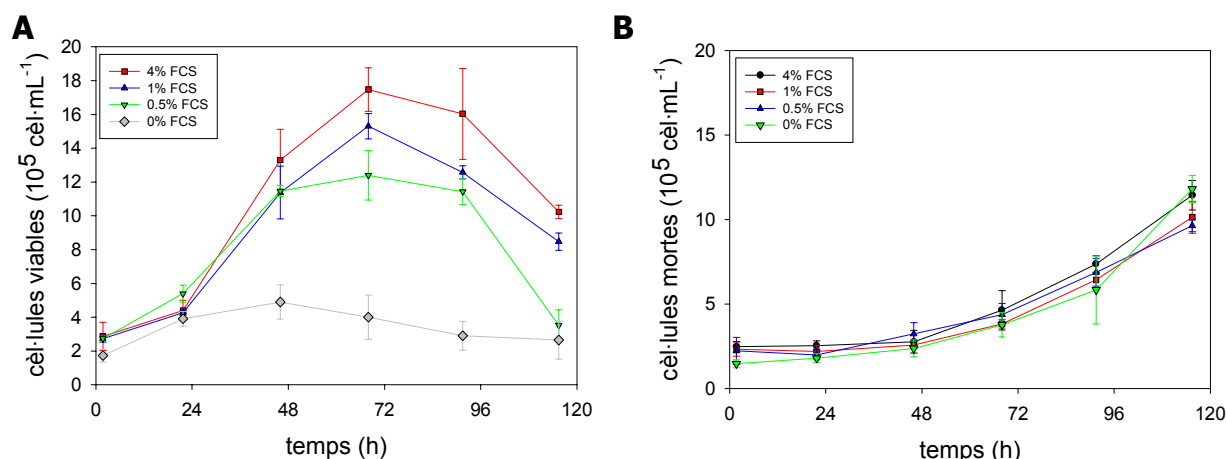


Figura 4.7. Efecte del sèrum en la viabilitat de l'hibridoma KB26.5. Evolució de la concentració de cèl·lules viables (A) i de no viables (B) en cultius amb diferents concentracions de sèrum.

De la mateixa manera que amb els cultius en els quals s'havia canviat la font de carboni, es va quantificar el nombre de cèl·lules mortes per apoptosi en els experiments amb concentracions decreixents de sèrum (veure Taula 4.4).

	Annexina-positives (%)	Cicle Cel·lular (%)		
		G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
FCS 4%	51.8 ± 6.3	34.77	60.33	4.9
FCS 1%	41.9 ± 3.0	53.8	39.7	6.5
FCS 0.5 %	48.2 ± 3.5	59.8	34.2	6.0
FCS 0%	53.1 ± 4.7	51.5	42.6	5.9

Taula 4.4. Percentatge de cèl·lules apoptòtiques i resultats de l'estudi de cycle cel·lular en els experiments de reducció de la concentració de sèrum. Les mostres van ser analitzades a les 72 hores d'experiment.

El nombre de cèl·lules que han iniciat el programa de mort cel·lular per apoptosi en cultius amb concentracions decreixents de sèrum al medi és sempre inferior als valors observats en els experiments de substitució de la principal font de carboni del medi.

En el Capítol 1 d'aquest treball, es mostrava com la supressió del FCS indueix la PCD. És possible que aquest tipus d'inducció de l'apoptosi es desenvolupi per unes rutes intracel·lulars diferents a les que s'activen en absència de glutamina o glucosa. Per tant, els mecanismes d'autodestrucció activats en una cèl·lula per la manca de sèrum podrien ser només una part dels que es donen per la manca de nutrients fonamentals com la glucosa o la glutamina. Això explicaria la lenta, però constant, progressió de l'apoptosi en les cèl·lules cultivades en aquest medi. Bo i això, aquesta acumulació de cèl·lules mortes és molt menor que la que s'observa en cèl·lules cultivades en condicions normals (veure Figura 4.1) de manera que si es realitzés una perfusió bifàsica disminuint la concentració de sèrum, probablement s'assoliria l'objectiu de disminuir els problemes que comporta l'acumulació de cèl·lules mortes.

En el cultiu amb medi sense sèrum, que mostrava un augment lleuger però apreciable en la concentració de cèl·lules viables (Figura 4.7), s'hi observa una aturada del cicle cel·lular en la fase G_1 , tot i que un percentatge de cèl·lules més elevat que en els experiments en que se substituïa la glucosa per altres fonts de carboni es troba en les fases G_2/M . Aquest cultiu disposa de glucosa, glutamina i oxigen dissolt en el medi de cultiu, de manera que la cèl·lula pot realitzar la majoria de processos catabòlics i anabòlics.

És molt probable que la presència de determinats factors proteics afecti directament o indirecta algunes de les activitats cel·lulars que es duen a terme durant el cicle cel·lular (replicació, transcripció, traducció).

Malgrat que es consideri la limitació per sèrum com a punt de partida per estratègies de cultiu bifàsiques, es poden realitzar modificacions genètiques en les cèl·lules amb la finalitat d'evitar la mort cel·lular (com es mostrarà en el Capítol 5).

4.2.3. Reducció de la concentració de fosfats

Els fosfats tenen un paper molt important com a constituents dels nucleòtids. Aquests, a banda de constituir DNA i RNA, també actuen com a transportadors d'energia química, especialment d'ATP, que participa en la transferència d'energia entre milers de reaccions cel·lulars diferents (Stryer, 1995).

Així doncs, es van realitzar experiments amb concentracions de fosfats compreses entre l'habitual al medi DMEM, $0.109 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, i la seva supressió total.

En aquests experiments, es van preparar tres cultius amb diferents formulacions (Taula 4.5): cultiu control amb medi complet DMEM 4% FCS; cultiu amb medi complet DMEM 4% FCS i 0.001 g·L⁻¹ de fosfats; cultiu amb medi complet DMEM 4% FCS sense fosfats. Es van utilitzar 30 mL de cadascun dels medis per a cada cultiu amb un inòcul de 3.0x10⁵ cèl·lules viables·mL⁻¹.

cultiu DMEM 4% FCS conc. fosfats (g·L⁻¹)

control	+	+	0.109
1	+	+	0.001
2	+	+	0

Taula 4.5. Quadre resum dels cultius realitzats en els experiments d'alentiment del cicle cel·lular per reducció de la concentració de fosfats.

A la Figura 4.8, es mostra com la reducció del percentatge de sèrum present en el medi provoca l'alentiment de la velocitat de creixement, però s'incrementa notablement el nombre de cèl·lules mortes.

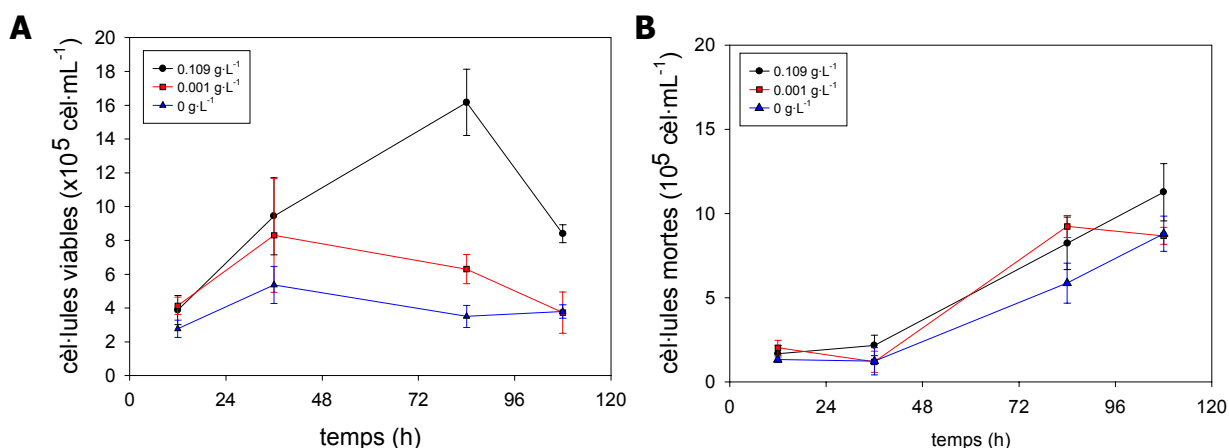


Figura 4.8. Efecte de la reducció de fosfats en la viabilitat dels cultius. Evolució de la concentració de cèl·lules viables (A) i de no viables (B) en cultius amb diferents concentracions de fosfats.

Els efectes més significatius i que ens donen una idea més clara del que està passant quan hi ha una limitació de fosfats en el medi de cultiu, es poden observar en el cas de la supressió dels fosfats en el medi. En aquesta situació, la cèl·lula no disposarà de fosfats per dur a terme la síntesi del material genètic i les reaccions on hi ha intercanvi d'energia.

L'efecte que s'observa en les gràfiques és que inicialment es produeix un lleuger creixement però, a continuació, hi ha un reajustament de la població degut a la insuficiència de fosfats en el medi, que no abasta a la correcta síntesi del material genètic i ATP. Una vegada assolit un estat

d'equilibri entre la concentració de fosfats i la densitat cel·lular, segons el que indica a la Figura 4.7, sembla que la divisió cel·lular es redueix considerablement.

A l'igual que en els casos anteriors, es va determinar el percentatge de cèl·lules apoptòtiques mitjançant l'anàlisi per citometria de flux utilitzant marcatge amb Annexina, i el percentatge de cèl·lules que es troben a les diferents fases del cicle cel·lular. Els valors obtinguts, que es mostren a la Taula 4.6, mostren l'elevat nombre de cèl·lules mortes, resultat d'aquelles cèl·lules que han endegat el programa de mort per apoptosi a mesura que es disminueix la concentració de fosfats al medi de cultiu.

	Annexina-positives (%)	Cicle Cel·lular (%)		
		G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
control positiu	51.8 ± 6.3	34.8	60.3	4.9
0.001 g·L ⁻¹ fosfats	69.3 ± 8.5	35.3	64.7	0.0
0 g·L ⁻¹ fosfats	79.4 ± 2.4	24.0	75.9	0.1

Taula 4.6. Resultats obtinguts en els estudis d'apoptosi. Es mostra el percentatge de cèl·lules que presenten la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana citoplasmàtica.

La reducció de fosfats a 0.001 g·L⁻¹, si bé permet mantenir el nombre de cèl·lules viables al llarg del temps, també mostra un increment apreciable del nombre de cèl·lules apoptòtiques que s'incrementa encara més quan els fosfats són suprimits totalment del medi. Sembla doncs que la reducció de la concentració de fosfats del medi de cultiu permet assolir aquella situació de manteniment de la densitat de cèl·lules viables que es mostrava a la Figura 4.3 però, bo i això, els resultats obtinguts ens la determinació del nombre de cèl·lules apoptòtiques indiquen que les cèl·lules mortes augmenten notablement de manera que així no és possible aconseguir l'objectiu que es pretenia i que es mostrava a la Figura 4.1, on el que es volia era mantenir la viabilitat i evitar l'increment del nombre de cèl·lules mortes dins el bioreactor.

4.3. Conclusions de les estratègies seguides per a l'aturada del cicle cel·lular

L'aturada del cicle cel·lular condueix a l'activació de la mort per apoptosi posant de manifest la inter-comunicació de la maquinària cel·lular de divisió amb la de mort. Així, és necessària la dissecció de les rutes de mort per trobar un punt d'actuació.

De les diferents formulacions de medis provades, cap ofereix una aturada del cicle cel·lular que no activi la PCD encara que la reducció de sèrum proporciona uns valors de mort inferiors dels obtinguts en els altres canvis realitzats. Així, malgrat que els resultats dels experiments realitzats demostren que és possible aturar el creixement cel·lular de l'hibridoma KB26.5, cal alhora protegir les cèl·lules de la inducció de la mort per apoptosi.

Per aquest motiu, es va comprovar la interferència inespecífica de les sals de zinc en el programa de mort per manca de nutrients, donat que en la bibliografia el Zn^{2+} és descrit com a citoprotector de limfòcits en condicions inductores de l'apoptosi (Stennicke i Salvesen, 1997; Chai et al., 1999).

4.4. Ús d'inhibidors inespecífics: el cas del Zn^{2+}

Com s'ha explicat anteriorment, es va explorar el potencial ús protector contra la mort per apoptosi d'agents no tòxics que tenen com a diana rutes de senyalització en el procés d'apoptosi. Amb aquesta finalitat, es varen realitzar experiments en els que se suplementava el medi de cultiu amb sals de zinc.

El zinc és un metall de transició descrit com a citoprotector de la dieta i antioxidant que estimula la proliferació cel·lular i la presència del qual, en determinades concentracions, suprimeix l'apoptosi (Chai et al., 1999). Sembla tenir efecte en la inhibició de les Caspases 3 i 6, així com també de l'endonucleasa encarregada de tallar en els espais internucleosomals el DNA genòmic de les cèl·lules apoptòtiques (Takahashi et al., 1996; Perry et al., 1997; Chai et al., 1999). La depleció del zinc indueix l'apoptosi depenent de Caspases (Murakami et al., 1999; Kolenko et al., 2001). Per això, es va dissenyar un experiment en el qual s'afegien sals de zinc a diferents concentracions i s'estudiava la recuperació dels cultius.

Els cultius preparats van ser (veure Taula 4.7): cultiu control negatiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i $ZnSO_4$ 1 mM; cultiu amb medi DMEM 2% FCS sense glutamina i $ZnSO_4$ 0.1 mM. Com en experiments anteriors, es van cultivar les cèl·lules en flascons no agitats amb 10 mL de cadascun dels medis i una concentració d'inòcul de 5.0×10^5 cèl·lules viables $\cdot mL^{-1}$. També es va preparar un control positiu

amb medi complet DMEM 2% FCS per verificar que l'indòcul creixia normalment en un medi amb tots els nutrients. Els resultats obtinguts en aquest control no han estat inclosos.

cultiu	DMEM	2% FCS	Gln	Zn ²⁺ (mM)
control negatiu	+	+	-	0
1	+	+	-	0.1
2	+	+	-	1
control positiu	+	+	+	0

Taula 4.7. Quadre resum dels cultius realitzats en els experiments de protecció amb Zn²⁺.

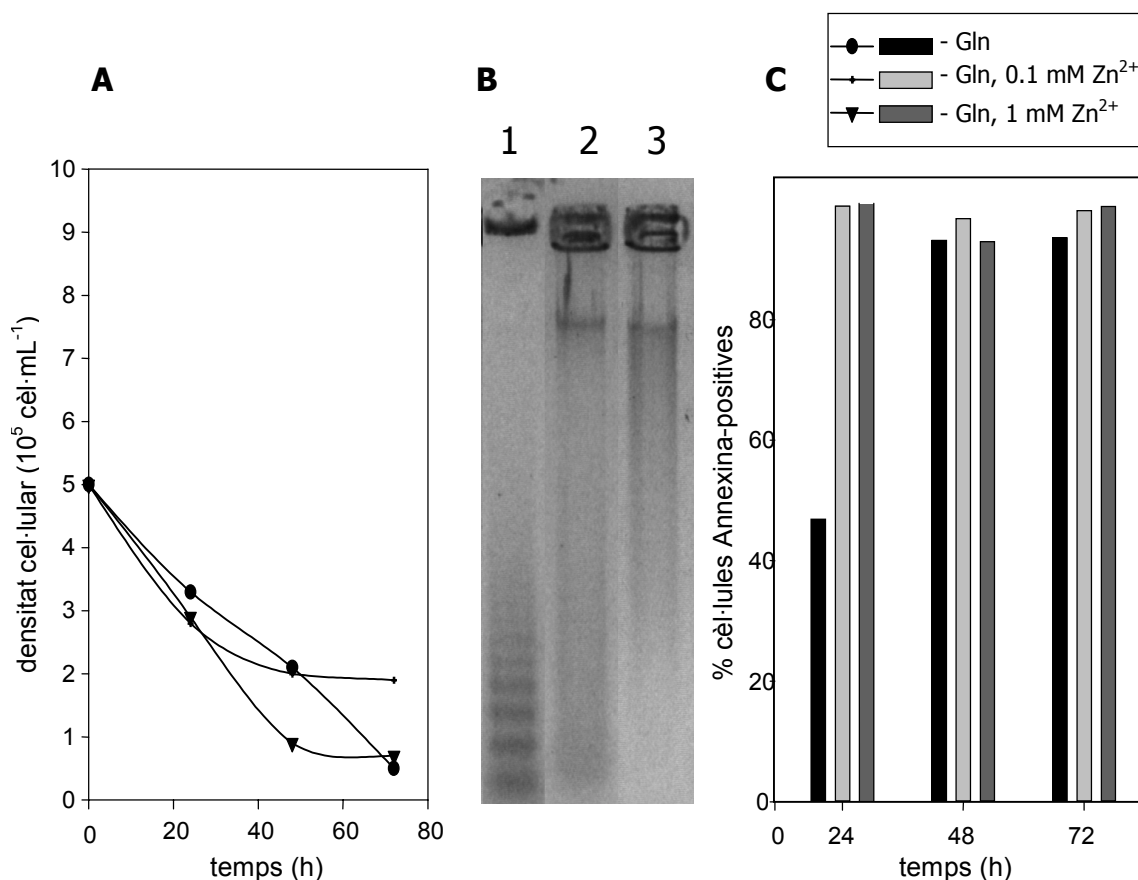


Figura 4.9. Efecte del Zn²⁺ en la viabilitat, fragmentació del DNA i translocació de la fosfatidilserina en cultius d'hibridoma KB26.5. A. Seguiment de les cèl·lules viables al llarg del temps; B. Observació de la fragmentació de DNA de mostres procedents d'extraccions de DNA genòmic de cultius cel·lulars crescuts en diferents condicions: DNA genòmic extret de cèl·lules cultivades en medi sense glutamina a les 60 h (carril 1); medi sense glutamina en presència de Zn²⁺ 0.1 mM (carril 2); i medi sense glutamina en presència de Zn²⁺ 1 mM (carril 3); C. Percentatge de cèl·lules que presenten translocació de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica, mitjançant detecció amb Annexina-V-Fluos per citometria de fluxe.

A la Figura 4.9, es mostren els resultats obtinguts en aquest experiment. No s'hi observa un efecte protector en la viabilitat cel·lular en les primeres 24 hores en cap dels dos cultius tractats amb zinc. Ara bé, la concentració més baixa de zinc, 0.1 mM, permet una aturada de la pèrdua de viabilitat que s'observa a partir de les 40 hores. De totes formes, concentracions de 0.1 mM i 1

mM no són capaces d'evitar la disminució de la viabilitat dels cultius. És més, la concentració més elevada, 1 mM, provoca una reducció més gran del nombre de cèl·lules viables. Això coincideix amb observacions fetes per Wang et al., 1999b, que conclouien que concentracions superiors a 0.3 mM condueixen a incrementar la mort per apoptosi.

En contrast amb aquests resultats, s'ha observat una inhibició de la fragmentació de la cromatina en les regions internucleosòmiques en múltiples de 200 pb del DNA en aquells cultius mancats de glutamina on es va addicionar el Zn^{2+} . No obstant això, a les 24 hores ja s'observen elevats percentatges de cèl·lules Annexina-positives en tots els cultius (47.0% pel control -Gln; 98.9% i 99.4% pels cultius tractats amb 0.1 mM i 1 mM de Zn^{2+}) i cap d'ells no es va poder recuperar passades les 24 hores després de la inducció del procés de mort per apoptosi.

En els darrers anys, alguns autors han suggerit el zinc com un dels principals reguladors intracel·lulars de l'apoptosi perquè els limfòcits mantenen el zinc intracel·lular a concentracions lleugerament per sobre d'aquelles necessàries per suprimir l'apoptosi (Shankar i Prasad, 1998) i que promou la mitosi i suprimeix l'apoptosi (Chou et al., 1999).

De totes formes, els resultats de Chou et al., 1999, i els obtinguts en aquest treball de tesi mostren que si bé el zinc pot tenir efectes inhibitoris, l'activació de les Caspases i la fragmentació del DNA poden ser suprimides pel zinc sense prevenir necessàriament la mort cel·lular.

Així doncs, si bé és evident la importància del zinc en els organismes -cal recordar que la majoria de teixits contenen 20-200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, i d'altres arriben a tenir 0.8-3 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ -, la suplementació de medis amb sals de zinc no aconsegueixen bloquejar els canvis morfològics ni de translocació de la fosfatidilserina de les cèl·lules cultivades en condicions inductores de l'apoptosi.

És per això que es va descartar el seu ús i es va provar, com es mostra en l'apartat següent, l'efecte dels inhibidors peptídics emprats en el capítol anterior en la protecció dels cultius on s'ha induït l'apoptosi i comprovar si l'acció d'aquests inhibidors es troba per damunt del límit a partir del qual les cèl·lules progressen irreversiblement en el seu programa de mort cel·lular.

4.5. Experiments de retorn de la viabilitat dels cultius

Donat que no es va aconseguir la protecció esperada mitjançant l'ús d'agents citoprotectors com el Zn^{2+} , es va passar a estudiar amb més profunditat l'efecte protector dels inhibidors peptídics emprats al Capítol 3.

Un cop coneguda la importància relativa d'algunes Caspases en el procés d'execució de l'apoptosi en l'hibridoma KB26.5, es va voler determinar fins a quin punt la seva inhibició específica permetria la recuperació de la viabilitat dels cultius després de determinats períodes de cultiu en condicions desfavorables. Si això fos possible, es coneixeria amb certa precisió el punt concret de la ruta bioquímica del programa d'execució de mort on caldria fer la intervenció genètica per a l'obtenció de noves línies cel·lulars d'hibridoma més resistents a l'apoptosi provocada per l'eliminació de nutrients. Per aquest motiu, es va preparar un experiment amb hibridomes cultivats en medi sense glutamina que després de diferents intervals de temps es tornaven a cultivar amb medi complet observant-se si es recuperava de nou la seva viabilitat. En cadascun d'aquests cultius, es va afegir també diferents inhibidors peptídics de les Caspases a la concentració òptima de cadascun tal i com s'havia determinat en els experiments previs mostrats al capítol anterior. Els cultius preparats van ser els mateixos que els mostrats en l'apartat 3.7.4. (DMEM 2% FCS sense glutamina i sense inhibidors; DMEM 2% FCS sense glutamina i z-VAD-fmk 100 μ M; DMEM 2% FCS sense glutamina i Ac-DEVD-cmk 200 μ M; DMEM 2% FCS sense glutamina, z-VAD-fmk 100 μ M i Ac-DEVD-cmk 200 μ M).

A partir de cadascun d'aquests quatre cultius, es van prendre alíquotes a les 12, 24, 36 i 60 hores que foren inoculades en plaques amb 2 mL de medi complet DMEM 2% FCS (2 rèpliques per cada condició diferent). Es va realitzar el seguiment de la concentració de cèl·lules viables present en cada moment en cadascun d'aquests cultius a través de microscòpia òptica i tinció amb blau de tripà.

Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 4.8. Com es pot observar, els únics cultius que van créixer novament després de 12 hores en absència de glutamina van ser aquells tractats amb alguns dels inhibidors de Caspases, ja fos z-VAD-fmk, Ac-DEVD-cmk o la seva combinació. De totes maneres, el resultat més destacable fou la possibilitat de fer créixer les cèl·lules i retornar-les als nivells de viabilitat superiors al 80% en aquelles mostres provinents del cultiu tractat amb ambdós inhibidors després de 12, 24 i 36 hores de ser cultivades en medi sense glutamina.

CULTIUS	temps (hores)			
	12	24	36	60
DMEM - Glutamina (Control negatiu)	-	-	-	-
DMEM - Glutamina + Z-VAD-fmk	+	-	-	-
DMEM - Glutamina + DEVD-cmk	+	-	-	-
DMEM - Glutamina + Z-VAD-fmk + DEVD-cmk	+	+	+	-

Taula 4.8. Recuperació de la viabilitat de les mostres extretes a diferents intervals de temps dels quatre cultius de l'experiment de retorn. Els símbols emprats representen el següent: '+' per als cultius capaços de recuperar la viabilitat quan es fan créixer de nou en medi amb glutamina; '-' per als cultius que no recuperen la viabilitat en medi amb glutamina.

Aquests resultats permeten concloure que la manca de glutamina és un estímul apoptòtic tan potent que no permet la recuperació de la viabilitat dels cultius 12 hores després d'haver-se exhaurit del medi. Per altra banda, la presència per separat dels inhibidors Ac-DEVD-cmk i z-VAD-fmk permet la recuperació dels cultius durant un interval de 12 hores, però únicament l'addició de tots dos inhibidors a la vegada permet allargar aquest període de recuperació del cultiu fins les 36 hores. Aquesta diferència es dona malgrat que, tal i com ja s'havia pogut observar a les Figures 3.22 i 3.23, el cultiu tractat únicament amb z-VAD-fmk i aquell tractat simultàniament amb ambdós inhibidors presentaven comportaments gairebé idèntics. Aquest fet indicaria que tot i que la inhibició de la Caspasa 9 sembla la manera més eficaç de retardar l'aparició de l'apoptosi, quan al mateix temps es bloqueja fortament l'acció de les Caspases 3 i 7 la inhibició és molt més efectiva, que permet aturar l'inici de l'apoptosi en un major percentatge de cèl·lules del cultiu i evitar la transmissió del senyal apoptòtic a través de la via de les cisteïna-proteases. Així, augmenten les possibilitats de mantenir un elevat nombre de cèl·lules viables no apoptòtiques i es facilita el retorn del cultiu als nivells òptims de viabilitat quan les cèl·lules són cultivades de nou en medis complets.

Els nostres resultats, bo i que no sigui possible la recuperació dels cultius més enllà de les 36 hores i que les cèl·lules acabin morint per apoptosi, corroboren altres resultats obtinguts per Joza et al., 2001, en referència a l'existència d'una via d'inducció complementària molt menys potent que la de les Caspases, que resulta en el desmantellament de la cèl·lula per una via apoptòtica independent (veure Figura 4.9). Tot i així, no es pot descartar l'acció d'altres Caspases, pel moment desconegudes, insensibles a la inhibició pels pèptids z-VAD-fmk i Ac-DEVD-cho, utilitzats en aquest treball.

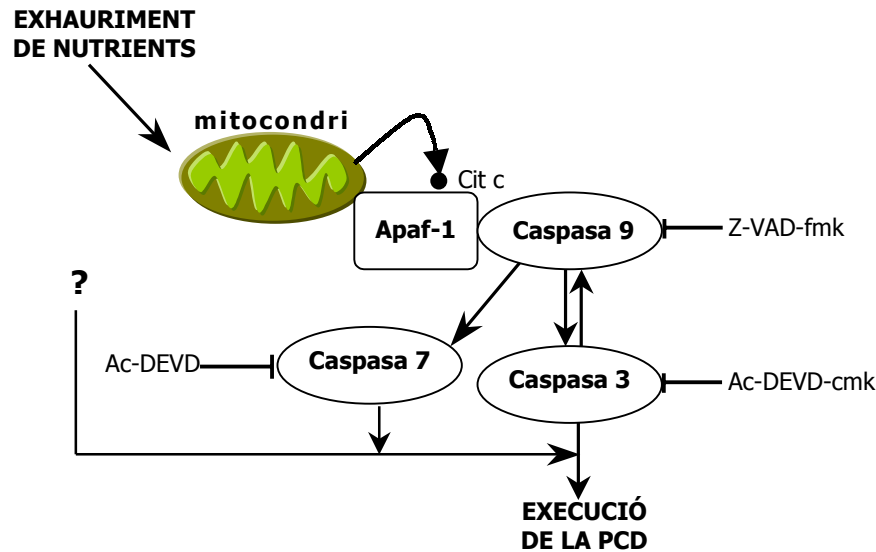


Figura 4.9. Esquema proposat d'actuació de les Caspases i de la seva inhibició pels pèptids modificats z-VAD-fmk i Ac-DEVD-cmk. Amb un interrogant es mostra la possible via alternativa activada bo i la presència dels inhibidors sintètics.

Aquestes dades ens porten a concloure que per a una inhibició genètica de l'apoptosi a través de la via de les Caspases, cal seleccionar prioritàriament com a dianes les Caspases 3, 7 i 9, ja que només així s'aconsegueix allargar fins a les 36 hores la durada d'un cultiu en medi sense glutamina.

De totes maneres, els resultats obtinguts indiquen que una única intervenció sobre aquests gens només permet allargar lleugerament la durada dels cultius. La millor manera d'inhibir la via de les Caspases passa, doncs, per l'acció conjunta sobre Caspases que es trobin a diferents nivells. Per això es proposa la inhibició simultània de les Caspases 3, 7 i 9.

A la Taula 4.9, es completa la informació que es mostrava a la Taula 3.3 respecte a les constants d'inhibició, K_i , dels pèptids sintètics per a les Caspases. En aquesta nova taula, es mostren les K_i de proteïnes que mimetitzen la inhibició del z-VAD-fmk i l'Ac-DEVD-cmk.

A partir d'aquestes dades, la proposta d'inhibició genètica de les Caspases 3, 7 i 9 es tradueix sobre el paper en la sobreexpressió en l'hibridoma de les proteïnes P35 (de baculovirus) i X-IAP (d'origen endogen de les pròpies cèl·lules d'hibridoma); si bé cal no oblidar l'acció de proteïnes protectores de l'alliberament del Citocrom c de mitocondri, com són els membres de la família del Bcl-2, que eviten l'activació de la via de les Caspases.

De totes formes, donats els bon resultats obtinguts amb aquests inhibidors, semblaria raonable proposar el seu ús enlloc de realitzar una modificació genètica de les cèl·lules. Sobretot considerant que els hibridomes són cèl·lules difícils de transfectar i que l'obtenció de clons es converteix en una tasca tediosa que consumeix molt de temps i esforços.

	Constants d'inhibició (K_i nM)				
	z-VAD-fmk	Ac-DEVD-cho	Ac-YVAD-cho	p35	X-IAP
Caspasa 1	2.5	15-18	0.76	9.0	no inhibeix ^{a,b}
Caspasa 2	2400	1710	>10000	inhibeix ^a	-
Caspasa 3	43	0.23-2.2	>10000	0.1	0.7
Caspasa 4	130	132	362	?	?
Caspasa 5	5.3	205	163	?	?
Caspasa 6	98	31	>10000	0.4	no inhibeix ^a
Caspasa 7	39	1.6	>10000	2.0	0.2
Caspasa 8	2.5	0.92	352	0.5	no inhibeix ^a
Caspasa 9	3.0	60	970	?	inhibeix^a
Caspasa 10	?	12	408	7.0	?

Taula 4.9. Inhibició de Caspases de mamífers per inhibidors de Caspases sintètics (z-VAD-fmk, Ac-DEVD-cho i Ac-YVAD-cho), virals (p35) i endògens de mamífers (X-IAP). ^a L'assignació 'inhibeix' o 'no inhibeix' està basada en assajos funcionals com el trencament de substrats fluorogènics, processat de Caspases o supervivència cel·lular; ^b impossible d'inhibir inclús en presència en excés 50 molar respecte de la Caspasa (Ekert et al., 1999).

Malauradament, l'ús del z-VAD-fmk i del Ac-DEVD-cmk és del tot inviable econòmicament a nivell de bioreactor (>150 €mg⁻¹). Per això, es fa necessària l'avaluació de la sobreexpressió de gens protectors que permetin bloquejar la ruta bioquímica de transducció del senyal apoptòtic en punts situats abans del moment a partir del qual la cèl·lula entra en una fase irreversible efectora de la PCD, que anomenem *límit d'intervenció*.

Essent coneixedors de les limitacions físiques de l'aportació de nutrients a les cèl·lules i dels accidents ocasionals inherents a la metodologia emprada en el monitoratge i control que porten a la manca d'alguns dels nutrients del medi, és aconsellable l'aplicació complementària de modificacions genètiques en la cèl·lula adreçades a l'optimització dels processos metabòlics cel·lulars o al retard de l'aparició de la mort cel·lular per apoptosi (Dickson, 1998).

El sèrum, a banda de permetre reduir el nombre de cèl·lules mortes que s'acumulen al bioreactor, també abareteix el preu del medi de cultiu i facilita la purificació del producte. Amb

tot, no se soluciona el problema de l'acumulació de cèl·lules mortes, per això se suggereix la modificació genètica de les cèl·lules de manera que es disposi d'una línia cel·lular capaç de resistir situacions inductores de l'apoptosi dins el bioreactor (Figura 4.10).

Una vegada conegudes les principals causes que condueixen a aquest tipus de mort en cultius d'hibridomes i les diferents estratègies que permeten la seva aturada, ens és possible dissenyar l'estratègia genètica que ofereixi la reducció en l'increment de cèl·lules mortes en els bioreactors quan es fa ús d'estratègies de cultiu en perfusió bifàsica, en les qual s'alenteix el creixement cel·lular canviant la formulació del medi.

D'altra banda, la modificació genètica de les cèl·lules ofereix la possibilitat d'introduir una *vàlvula* de seguretat que permeti rescatar de l'apoptosi els cultius de cèl·lules animals que accidentalment es vegin sotmeses a condicions inductores de l'apoptosi. Això contribueix a la creació d'un sistema de cultiu més robust que evitaria l'enorme pèrdua de rendibilitat en el procés d'obtenció del producte desitjat que es dona quan un cultiu entra en la fase de mort per apoptosi. Per aquest motiu, en el capítol següent es mostren diferents estratègies genètiques per inhibir o retardar l'aparició de l'apoptosi i que, per tant, ajudin a perllongar la durada dels cultius i millorar la productivitat del bioprocés.

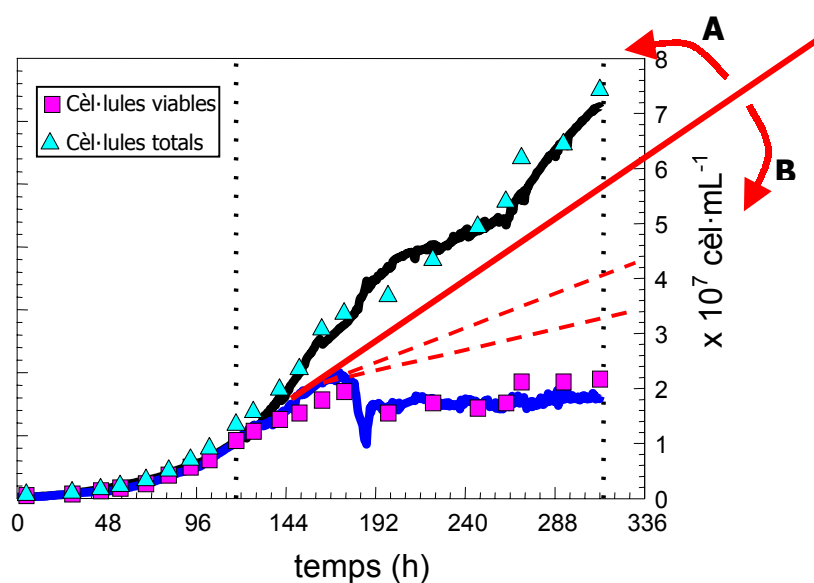


Figura 4.10. Evolució del nombre de cèl·lules viables i no viables en un cultiu d'hibridoma KB26.5 en perfusió (Gàmez, 2000). En **A**, s'observa la gran nombre de cèl·lules mortes que s'acumulen al bioreactor. Únicament la reducció de la concentració de sèrum del medi permet disminuir el nombre de cèl·lules mortes que s'acumulen als reactors (la regió **B** marca l'objectiu d'aquest treball). No obstant això, es continua observant cert nombre de cèl·lules mortes que, mitjançant estratègies de modificació genètica, podria ser reduït encara més.