



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Y EXACTAS**

**Centro de Estudios de Biotecnología
Industrial**

**Título: Producción de sobrenadante anti-B
en un medio de cultivo alternativo.**

**Tesis en Opción al Título Académico de Máster en
Biotecnología.**

Mención Biotecnología Industrial

Autor: Ing. Henry Zorrilla Soto

Tutor: Dra.C. Suyén Rodríguez Pérez

Santiago de Cuba

2020

Dedicatoria

Dedicatoria

A mi MADRE y mi tío JOSÉ en especial

A mi Familia

A mis amigos y Compañeros.

Agradecimientos

Agradecimientos

Agradecer a toda mi familia en general, en especial a mi MADRE y a mi tío JOSÉ por siempre aconsejarme y apoyarme en todo momento, a Solanch por comprenderme en los momentos más difíciles.

A Suyen, por su entrega, por darme todo su apoyo y su confianza, por otorgar todos sus conocimientos e impulsarme a progresar profesionalmente.

A mis primeros compañeros y amigos Alexi, Lisset, Giorky, Osmany y Karina que desde muy lejos me apoyan incondicionalmente, y en especial a Yanet.

A mi grupo PIF por ser como una familia para mí a pesar de los pesares.

A mis compañeros de la maestría por compartir con ellos momentos inolvidables.

A todo el colectivo de compañeros de trabajo de LABEX en especial al grupo de Producción y de Inspección y Ensayo.

A los profesores de la Maestría. En especial a las profesoras Catalina y Suyen a las cuales admiro mucho.

A TODOS MUCHAS GRACIAS.....

Resumen

Resumen

El descubrimiento del grupo sanguíneo ABO por el científico austríaco Karl Landsteiner, como también sus antígenos, marcaron un paso importante en el desarrollo de la medicina transfusional, lo que hizo más segura la transfusión de sangre en el mundo. Con el desarrollo de reactivos hemoclasificadores ABO mediante la aplicación de la tecnología hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales (AcM) también marco un punto importante en la eficacia de la medicina transfusional. El hemoclasificador ior® HemoCIM Anti-B es uno de los productos obtenidos en CIM-LABEX, éste junto a otros es uno de los más esenciales y demandados tanto nacional como internacional por Hospitales y Bancos de Sangre. El IFA sobrenadante anti-B obtenido del cultivo del hibridoma anti-B en el medio usualmente utilizado, no cumple con los estándares de calidad o liberación que establece el Sistema de Gestión de la Calidad de LABEX. El objetivo principal del siguiente trabajo investigativo es incrementar la productividad del hibridoma anti-B evaluando variantes de medios de cultivo de la plataforma del CIM. La evaluación se realizó a partir de una caracterización cinética del hibridoma en varios medios de cultivo de la plataforma de CIM-LABEX como RPMI 1640, DMEM/F-12 y PFHM-II, resultando el DMEM/F-12 suplementado con 8 % de SFB como el de mejor desempeño en cuanto concentración de las células vivas, viabilidad, potencia y avidez con valores superiores a los 2×10^6 cel/mL, 90% y 2048 respectivamente, llegando a valores inferiores de avidez por debajo de los 10 s. Se evaluaron otras alternativas de medios de cultivo como medios de cultivos suplementados y mezclas de medios, a partir del cumplimiento de los requisitos de calidad y liberación en cuanto a potencia, avidez e intensidad, utilizando el DMEM/F-12 y PFHM-II como medios de cultivo, Cell Boost 5 y Suero Fetal Bovino como suplementos, quedando como el de mejor desempeño el DMEM/F-12 suplementado con Cell Boost 5 (D+C) alcanzando una potencia de 1024, avidez de 5 s e intensidad de 1+ en ambos parámetros. Con la base de los resultados anteriores se propusieron tres alternativas de procesos de producción empleando los frascos rotatorios para la obtención de la IFA sobrenadante anti-B y se analizaron económicamente hasta la conformación del producto final, resultando como la mejor propuesta económicamente analizada el proceso de producción empleando el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8% de SFB arrojando un costo total de producción de **61525.78 UM/a** con una ganancia de **844654.22 UM/a**, con un volumen de producción total de sobrenadante anti-B para formulación de **41.25 L** diluido hasta 4 veces para cumplir la demanda anual de **30 000 frascos (165 L)** en un tiempo de **45 días** al año.

Abstract

Abstract

The discovery of the ABO blood group by Austrian scientist Karl Landsteiner, as well as its antigens, marked an important step in the development of transfusional medicine, making blood transfusion safer in the world. With the development of ABO hemoclassifying reagents through the application of hybridoma technology for the production of monoclonal antibodies (mAbs), I also mark an important point in the efficacy of transfusion medicine. The ior® HemoCIM Anti-B hemoclassifier is one of the products obtained at CIM-LABEX, this along with others is one of the most essential and demanded both nationally and internationally by Hospitals and Blood Banks. The anti-B supernatant IFA obtained from the culture of the anti-B hybridoma in the usually used medium does not comply with the quality or release standards established by the LABEX Quality Management System. The main objective of the following research work is to increase the productivity of the anti-B hybridoma by evaluating variants of culture media of the CIM platform. The evaluation was carried out from a kinetic characterization of the hybridoma in various culture media of the CIM-LABEX platform such as RPMI 1640, DMEM/F-12 and PFHM-II, resulting in DMEM/F-12 supplemented with 8% of SFB as the one with the best performance in terms of concentration of live cells, viability, potency and avidity with values higher than 2×10^6 cells / mL, 90% and 2048 respectively, reaching lower values of avidity below 10s. Other alternatives of culture media such as supplemented culture media and media mixtures were evaluated, based on compliance with the quality and release requirements in terms of potency, avidity and intensity, using DMEM/F-12 and PFHM-II as Culture media, Cell Boost 5 and Fetal Bovine Serum as supplements, being the best performing DMEM/F-12 supplemented with Cell Boost 5 (D+C) reaching a power of 1024, avidity of 5 s and intensity of 1+ in both parameters. Based on the previous results, three alternatives of production processes were proposed using the rotary bottles to obtain the anti-B supernatant IFA and they were economically analyzed until the final product was formed, resulting in the best economically analyzed proposal being the process of production using the DMEM/F-12 culture medium supplemented with 8% SFB, yielding a total production cost of 61525.78 UM/a with a gain of 844654.22 UM/a, with a total production volume of anti-B supernatant for formulation of 41.25 L diluted up to 4 times to meet the annual demand of 30,000 bottles (165 L) in a time of 45 days a year.

Glosario de Términos

Glosario de Términos

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno

AcM: Anticuerpo monoclonal

SFB: Suero Fetal Bovino

cel: Células

CIM: Centro de Inmunología Molecular

OSDE: Organización Superior de Dirección Empresarial

Ig: Inmunoglobulinas

IgM: Inmunoglobulina M

PNO: Procedimiento Normalizado de Operación

BM: Banco Maestro

Pot: Potencia

máx: Máxima

CECMED: Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos.

LABEX: Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales

INS: Insulina

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo

LAM: Líquido Ascítico Murino

GE: General Electric

HC: Cadena pesada

LC: Cadena ligera

VL: Región variable de la cadena ligera

CL: Región constante de la cadena ligera

CDR: Región Determinante de la Complementariedad

VH: Región variable de la cadena pesada

CH: Región constante de la cadena pesada

col.: Colaboradores

SSF: solución salina fisiológica

SN: Sobrenadante

RPMT: Roswell Park Memorial Institute

PFHM: Protein Free Hybridoma Medium

DMEM: Dulbecco's Modified Essential Medium

ADN: Ácido desoxirribonucleico

TK: timidina quinasa

HGPRT: hipoxantina guanina fosforibosil transferas

HAT: hipoxantina, aminopterina y timidina

FDA: Food and Drug Administration

O₂: oxígeno

CO₂: Dióxido de Carbono

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

CHO: Ovario de hámster chino

NS0: Secreter Nulo

GS: Glutamina Sintetasa

AC: Autorización de Comercialización

SGC: Sistema de gestión de calidad

SNS: Sistema nacional de salud

CB5: Cell Boost 5

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

MEM: Medio esencial mínimo de Eagle

IMDM: Medio Dulbecco modificado por Iscove

RLEC: Célula epitelial de hígado de rata

PM: Peso Molecular

Tr: Tiempo de retención.

Abs: Absorbancia

DO: oxígeno disuelto

Índice

Índice

1. Introducción.....	1
2. Revisión Bibliográfica.....	4
2.1. Generalidades de las inmunoglobulinas o anticuerpos.....	4
2.2. Hibridomas y producción de anticuerpos monoclonales.....	5
2.3. Cultivo celular.....	8
2.4. Sistemas y Modos de cultivo celular.....	10
2.4.1. Sistemas adherentes.....	10
2.4.2. Sistemas en suspensión.....	10
2.4.3. Modos de Cultivo celular.....	11
2.4.4. Crecimiento celular y variables críticas.....	12
2.5. Medios de cultivo para células superiores.....	14
2.5.1. Optimización de medios de cultivos.....	20
2.5.2. Adaptación a los medios de cultivo.....	20
2.5.3. Métodos para incrementar la productividad volumétrica.....	21
2.6. Reactivos Hemoclasificadores.....	22
2.6.1. Antígenos para identificación del Sistema ABO.....	22
2.6.2. Reacciones serológicas.....	24
2.6.3. Pruebas para determinar el grupo sanguíneo ABO (sistema ABO).....	25
2.6.4. Importancia clínica del sistema sanguíneo ABO.....	26
2.6.5. Ámbito regulatorio para reactivos hemoclasificadores.....	26
2.7. Análisis de económico.....	28
3. Materiales y Métodos.....	34
3.1. Línea celular de hibridoma.....	34
3.2. Medios de cultivo y suplementos.....	34
3.2.1. Medios de cultivo utilizados.....	34
3.2.2. Suplementos utilizados en los medios de cultivo.....	35
3.3. Diseño de mezclas de medios de cultivo a utilizar y empleo de suplementos.....	35
3.4. Cultivo celular.....	37
3.4.1. Cultivo celular a escala de laboratorio.....	37
3.4.2. Adaptación del hibridoma a otros medios de cultivo.....	37
3.4.3. Caracterización cinética del hibridoma anti-B.....	38
3.4.3.1. Determinación de variables y parámetros cinéticos.....	38

3.5. Técnicas analíticas utilizadas en el estudio.....	39
3.5.1. Separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de la molécula de IgM. 39	
3.5.2. Medición de la actividad biológica de los sobrenadantes.	40
3.6. Procesamiento y Análisis de los resultados.....	41
3.7. Análisis económico	41
4. Resultados y Discusión	42
4.1. Análisis de la información obtenida sobre los medios de cultivo y su utilidad en el crecimiento de hibridoma anti-B.....	42
4.2. Adaptación del hibridoma anti-B a diferentes medios de cultivo celular.	49
4.3. Caracterización cinética del hibridoma anti-B en los diferentes medios de cultivo.....	54
4.4. Medición de la actividad biológica de los sobrenadantes anti-B obtenidos en la caracterización cinética.....	57
4.5. Perfiles de los medios de cultivos y sobrenadantes ensayados en cromatografía de exclusión por HPLC.....	60
4.5.1. Caracterización cromatográfica del medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 8% de SFB y sobrenadante anti-B obtenido.	60
4.5.2. Caracterización cromatográfica del medio RPMI-1640 suplementado con 8% de SFB y el sobrenadante anti-B obtenido.	61
4.5.3. Caracterización cromatográfica del medio PFHM II y del sobrenadante anti-B obtenido.....	63
4.6. Resultado de la actividad biológica del sobrenadante colectado del cultivo del hibridoma en las mezclas de medios de cultivo.....	64
4.7. Propuestas de procesos productivos para la obtención del sobrenadante anti-B..	66
4.7.1. Propuesta de producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios en RPMI 1640 suplementado con SFB.	66
4.7.2. Propuesta de producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios en DMEM/F-12 suplementado con Cell Boost 5.....	68
4.7.3. Propuesta de producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios en DMEM/F-12 suplementado con SFB.....	68
4.8. Análisis económico de las propuestas productivas.....	69
5. Conclusiones.....	72
6. Recomendaciones.....	73
7. Bibliografía	74
8. Anexos	99

Introducción

1. Introducción

El comienzo de la biotecnología en Cuba fue prematuro, empezó a principios de los años 80, cuando nacían las primeras empresas biotecnológicas en Estados Unidos y diez años antes de que ocurriera algo similar en Europa. Apoyándose en la gran formación del personal profesional y científico durante los años 60 y 70.

El Centro de Inmunología Molecular (CIM) (**Fig. 1**) fue inaugurado el 5 de diciembre de 1994 por el comandante en jefe Fidel Castro, quien señalaba: *"Debo añadir que hay muy pocos centros en el mundo como este. Es un centro a nivel mundial en su construcción, en su limpieza, en su equipamiento, son lo más modernos, pero, sobre todo, hay algo en lo que yo estoy seguro de que nadie nos ganará en el mundo y es en la calidad de hombres y mujeres que van a trabajar, o que ya están trabajando en este centro. [...] Es un orgullo en pleno período especial inaugurar este centro, que no es un lujo, es una promesa de salud y bienestar para nuestro pueblo, es una promesa de ingresos para nuestra economía"*.

De esta manera quedó definida la misión del CIM: "Obtener y producir nuevos biofármacos destinados al tratamiento del cáncer y otras enfermedades crónicas no transmisibles e introducirlos en la salud pública cubana. Hacer la actividad científica y productiva económicamente sostenible y hacer aportes a la economía del país". Es una institución biotecnológica cubana de ciclo cerrado (investigación-desarrollo, producción, comercialización), que a partir del cultivo de células superiores orienta su investigación básica, desarrollo y fabricación de productos al tratamiento del cáncer y otras enfermedades autoinmunes. Actualmente se subordina a la Organización Superior de Dirección Empresarial (OSDE) BIOCUBAFARMA (<https://www.biocubafarma.cu/>).

Es el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, de Santiago de Cuba, conocido por su nombre comercial LABEX, la única Dirección de Negocios del CIM que se encuentra fuera de La Habana; es la encargada de diseñar y producir diagnosticadores para la evaluación *in vitro* de enfermedades no transmisibles y el serotipaje de grupos sanguíneos. Esta última línea de productos, la hereda de su integración primaria con el Ministerio de Salud, a partir de su inauguración hace 25 años, transitando de tecnologías basadas en anticuerpos policlonales a el uso de anticuerpos monoclonales (AcM) para diagnóstico. Hoy se constituye el LABEX como el único productor de hemoclasificadores del país y su cartera de productos están destinados al mejoramiento integral de la salud de los cubanos y la generación de bienes y servicios exportables, como resultado del desarrollo científico-técnico alcanzado.

Los anticuerpos específicos (Ac) o también llamados inmunoglobulinas específicas (Ig) son proteínas que se unen a moléculas llamadas antígenos (Ag), especialmente a ciertas regiones denominadas determinantes antigénicos o epítomos (Kindt y col., 2007). Las reacciones entre antígenos y anticuerpos son la base de los inmunoensayos y estos constituyen el fundamento de muchos diagnosticadores (Gómez y col., 2008).



Figura 1. Centro de Inmunología Molecular (CIM)

En los mamíferos los anticuerpos son producidos naturalmente por los linfocitos B. Cada estirpe de linfocito presente en el cuerpo secreta un anticuerpo diferente por lo que el suero sanguíneo no resulta adecuado para producir anticuerpos monoclonales. Estos son producidos a partir de una línea celular híbrida (hibridoma anti-B), procedente de la fusión de un linfocito B productor del anticuerpo de interés, con una línea celular de mieloma, el cual es el primer método para producir anticuerpos homogéneos o monoclonales con una especificidad conocida y fue descrito por Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975. Su obtención puede ser por vía *in vivo* o *in vitro* (Köhler y Milstein, 1975).

El ior® HemoCIM Anti-B es uno de los productos obtenidos en LABEX, el cual es utilizado por la red nacional de hospitales y bancos de sangre del país, en la determinación del grupo sanguíneo B y otros grupos portadores del antígeno B según el sistema de clasificación ABO, con alto impacto en la medicina transfusional (CECMED, 2017). En el año 2011 hubo un cambio en las exigencias regulatorias y como resultado, los parámetros de calidad se elevaron al mismo nivel de los máximos estándares internacionales; situación que impidió continuar la comercialización del reactivo ior® HemoCIM Anti-B que se producía por vía *in vivo* en LABEX. Por otro lado, a partir de esta fecha la demanda del hemoclasificador anti-B comienza a aumentar paulatinamente, situación que obliga a tomar como decisión producir *in vitro* el hemoclasificador anti-B, desarrollándose la tecnología fermentativa con biorreactores desechable (Zorrilla, 2011).

En la tecnología de producción *in vitro* es indispensable la utilización de soluciones u otras materias primas que las células puedan utilizar como nutrientes (medios de cultivo), facilitando un ambiente químico-físico adecuado y favoreciendo el proceso de crecimiento celular y la producción del compuesto de interés: en este caso el AcM (<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>). En el desarrollo del diagnosticador ior® HemoCIM Anti-B, en el LABEX se adquirió una nueva línea de hibridoma anti-B, la cual se investigó y desarrolló, logrando establecer y registrar el proceso de producción de IFA sobrenadante anti-B en frascos rotatorios Rollers, empleando el medio cultivo RPMI 1640-F1 suplementado con suero fetal bovino al 8% (Casado, 2017; Zorrilla, 2011).

Este proceso descrito anteriormente y establecido para la producción del AcM anti-B, tiene como desventaja la gran cantidad de suero fetal bovino (SFB) que se tiene que utilizar como suplemento, el cual eleva los costos del proceso productivo. Por otro lado, la demanda nacional y los compromisos internacionales de este producto aumentan paulatinamente, por lo que es necesario estudiar, formular, mejorar u optimizar los medios de cultivo para elevar la productividad del hibridoma, en base a un mejor aprovechamiento de su metabolismo y acceso a nutrientes esenciales y, por tanto, el mayor rendimiento de la producción del AcM de interés, en la formulación del IFA, con los estándares de calidad que se requieren.

La optimización de un medio de cultivo de interés industrial no es sólo el logro de una formulación racional del medio, sino también la posible inclusión de materias primas de bajo costo, la reducción técnicamente viable de componentes en su formulación, etc., que haga rentable el proceso y promueva una mayor productividad de anticuerpos por el hibridoma.

De acuerdo con la limitación anteriormente expuesta, la presente investigación se plantea como:

Problema científico

La productividad actual de IgM del hibridoma anti-B, no permite cumplir con los requisitos de liberación que establece el Sistema de Gestión de la Calidad de LABEX, ni utilizar el IFA sobrenadante anti-B para la producción del **ior® HemoCIM Anti-B**; limitando sustituir la importación este reactivo hemoclasificador.

Hipótesis

Es posible incrementar la productividad de la IgM del hibridoma anti-B utilizando otros medios de cultivo y sus variantes, de la plataforma fermentativa del CIM; que, con su utilización se cumpla con los requisitos de calidad o liberación del sobrenadante anti-B, para la conformación del reactivo comercializable Hemoclasificador anti-B.

Objetivo General

Incrementar la productividad del hibridoma anti-B, evaluando variantes de medios de cultivo de la plataforma del CIM, para cumplir con los requisitos de calidad o liberación de la IFA y garantizar la comercialización del reactivo Hemoclasificador anti-B.

Para dar cumplimiento al Objetivo General, el mismo fue desglosado en los objetivos específicos siguientes:

Objetivos Específicos

1. Evaluar propuestas de medios de cultivos de la plataforma del CIM, para el cultivo del hibridoma anti-B y la obtención del IFA.
2. Determinar la productividad del sobrenadante obtenido del cultivo del hibridoma en los medios de cultivos seleccionados a partir del cumplimiento de los requisitos de calidad o liberación.
3. Proponer proceso(s) fermentativos para la obtención de sobrenadante anti-B, evaluando su(s) costos económicos.

Revisión Bibliográfica

2. Revisión Bibliográfica.

2.1. Generalidades de las inmunoglobulinas o anticuerpos.

Hebermans propuso el término de inmunoglobulinas para designar a todas las sustancias con capacidad de anticuerpo. Hoy se conocen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgA, IgG, IgD e IgE, cada una de ellas con ciertas características distintas (**Tabla 1**) (https://www.3tres3.com/articulos/inmunidad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura_38562/).

Las inmunoglobulina o anticuerpos son glicoproteínas de unión a epítipo que existen en dos formas, como constituyentes unidos a membrana de las células B o como moléculas solubles secretadas por células plasmáticas (*Kindt y col., 2007*). Como juegan un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune también se conocen como inmunoglobulinas, las cuales pueden aparecer en dos formas: sobre la superficie de las membranas de los linfocitos B, donde actúan como receptores para los antígenos, o secretados en fluidos biológicos, tejidos y mucosas donde neutralizan toxinas e impiden la entrada y propagación de elementos patógenos (*Miranda, 2011*).

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son capaces de generar numerosas respuestas tras su unión a los antígenos. Esas respuestas efectoras dependen del extremo carboxiterminal de cada isotipo, que determina el tipo de unión a determinados receptores de membrana de las células y la capacidad de fijar el complemento. Cada molécula de anticuerpo está formada por cuatro cadenas, dos ligeras y dos pesadas, cada una de ellas idénticas; unidas por puentes disulfuro que forman una estructura espacial similar a una **-Y-** (**Fig. 2**). Estas tienen dos funciones fundamentales: el reconocimiento y la unión al antígeno, que llevan a cabo mediante los extremos amino terminales de las cadenas; y se incluye una tercera, la función efectora, realizada por el extremo carboxiterminal de las cadenas pesadas (*García, 2011*).

Las cadenas ligeras tienen una porción variable de la que depende la especificidad, y una región constante que difiere según se trate de cadenas ligeras κ o λ . Las cadenas pesadas poseen, una región variable y una constante, la cual determinará las clases o isotipos principales de inmunoglobulina (Ig): γ , μ , α , δ y ϵ , que formarán respectivamente, las IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Además, la IgA tiene 2 subclases, IgA1 e IgA2, y la IgG se divide en 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las propiedades de las Ig dependen de cada clase y subclase. Una vez secretadas, las Ig son monoméricas, con excepción de la IgA, que forma dímeros y de la IgM, que forma pentámeros (https://www.3tres3.com/articulos/inmunidad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura_38562/).

Las inmunoglobulinas pueden estar constituidas por unidades básicas simples, como es el caso de la IgG, IgD e IgE; en forma de dímeros (dos unidades básicas unidas), como es el caso de la IgA, o incluso por hasta cinco estructuras básicas unidas por sus extremos Fc como es el caso de la IgM (**Fig. 3**). Esto se debe a la cualidad que tienen las cadenas m y a de unirse entre sí. Esta unión se realiza a través de la cadena J y mediante puentes disulfuro.

Tabla 1. Algunas características bioquímicas de las inmunoglobulinas.

Clase	PM (kDa)	Coefficiente* sedimentación	Velocidad síntesis**	Vida media (días)	Contenido carbohidratos (%)
IgG	150	6,5	28	30	2,5
IgA	160	7,7	10	8	10
IgM	900	19	7	10	11
IgD	180	7	0,016	0,4	10
IgE	280	8	0,0005	---	10

*(S),Unidad svedberg ** (mg/Kg/día)

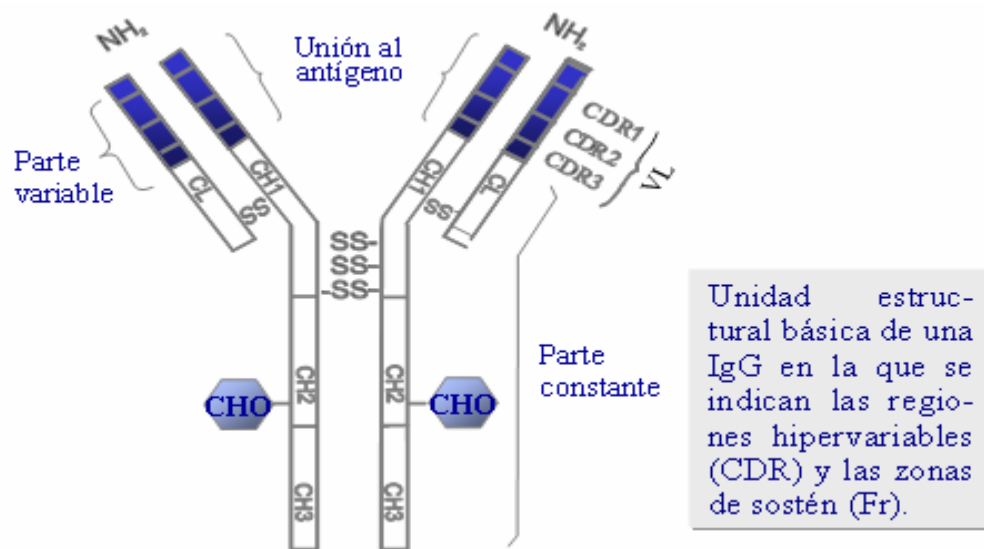


Figura 2. Unidad estructural de un Anticuerpo o Inmunoglobulina. (Tomado de https://www.researchgate.net/publication/233794658_Inmunoglobulinas)

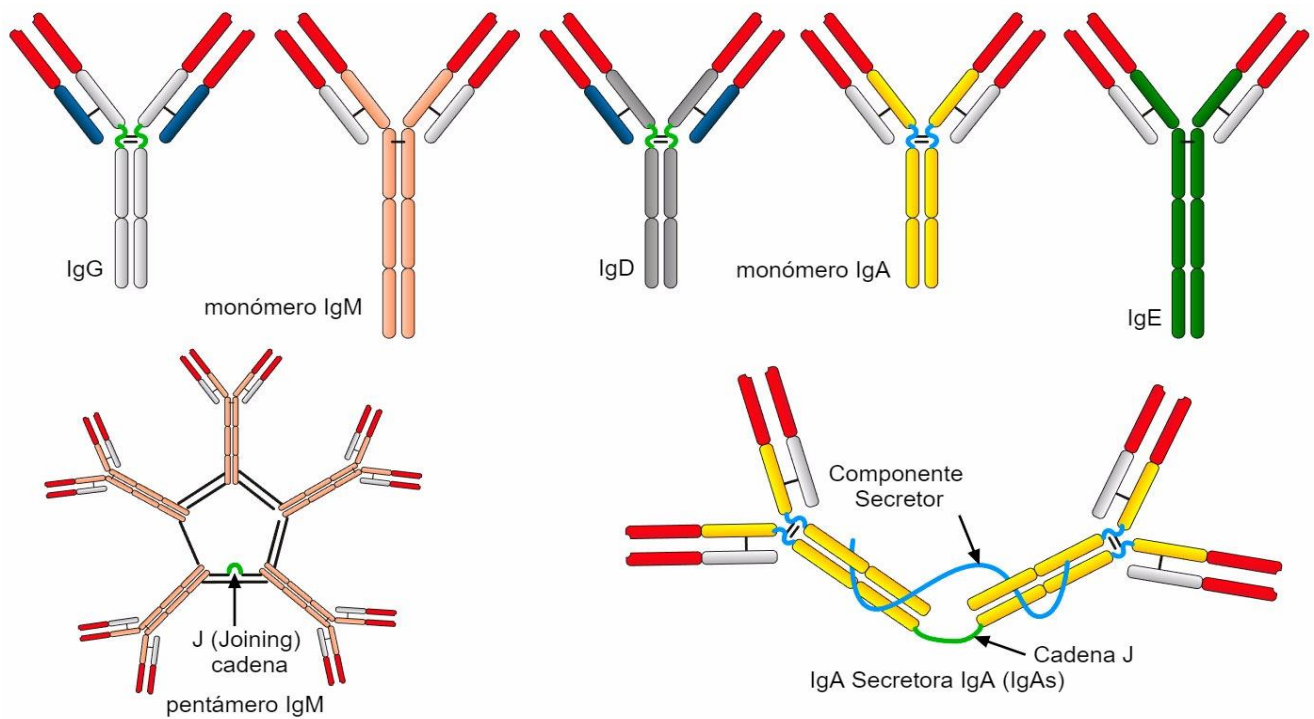


Figura 3. Tipos de anticuerpos (Tomado de https://www.3tres3.com/articulos/inmunidad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura_38562/).

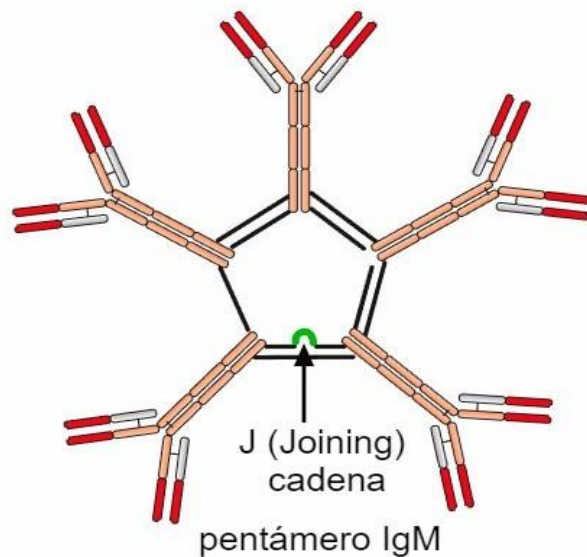


Figura 4. Estructura de la Inmunoglobulina M.
(Tomado de https://www.3tres3.com/articulos/inmunidad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura_38562/)

En las inmunoglobulinas aparecen, además de las cuatro cadenas polipeptídicas básicas, un componente glucídico (que representa el 2-14 % del peso total de la molécula) y en algunas clases de inmunoglobulinas, glicoproteínas adicionales conocidas como cadena J y pieza de secreción. La cadena J es una glicoproteína con un 12 % de azúcares y un peso molecular de 15 kDa que une, mediante puentes disulfuro, extremos Fc en la IgA e IgM. La pieza de secreción es una glicoproteína de 58 kD de peso molecular que sintetizan las células epiteliales de las mucosas y glándulas exocrinas (https://www.3tres3.com/articulos/inmunidad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura_38562/).

➤ **Inmunoglobulina M**

La **inmunoglobulina M** es una clase de anticuerpo conocida por ser la primera defensa contra varios antígenos. Las IgM son producidas por el sistema inmunitario y tienen un papel importante en las respuestas de inmunidad humoral primaria y adaptativa (Vollmers y Brändlein, 2009). Esta clase de anticuerpos tiende a ser menos específico, por lo que reconoce una gran variedad de antígenos de patógenos, es altamente activo en las reacciones citotóxicas y citolíticas, debido a que provocan una activación superior del sistema del complemento (Mader y col., 2013). En cuanto a los patógenos bacterianos o virales, las IgM son las primeras moléculas inmunes que se unen a los epítomos derivados de la membrana de estos organismos (Horn, y col., 2010). Además, la clase IgM puede ser útil como coadyuvante de vacuna, ya que actúa como receptores solubles a través de la formación de complejos con el antígeno (Ilag, 2011).

Al igual que otras moléculas de anticuerpos, la clase de IgM consiste en estructuras de subunidades de la cadena pesada (HC) y ligera (LC) que se ensamblan en polímeros superiores. En el suero humano la forma predominante es el pentámero de peso molecular aproximado de aproximadamente 950 kDa, que está compuesto por cinco monómeros conectados con un polipéptido denominado cadena de unión (**Fig. 4**). Alternativamente, se encuentran hexámeros de 1100 kDa, con frecuencia bastante baja *in vivo* (Brewer y col., 1994).

Los anticuerpos anti-ABO naturales se han considerado durante mucho tiempo como predominantemente del isotipo IgM, pero también se producen durante la vida, en determinadas etapas, anticuerpos del isotipo IgG (Milland y Sandrin, 2006; Spalter y col., 1999).

2.2. Hibridomas y producción de anticuerpos monoclonales.

Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B, descendiente de una sola y única célula madre, y una célula plasmática tumoral (Kindt y col., 2007). Los anticuerpos monoclonales (Mab, del inglés *monoclonal antibody*), son anticuerpos idénticos porque son producidos por un solo tipo de célula del sistema inmune, es decir todos los clones proceden de una sola célula madre. Es posible producir anticuerpos monoclonales que se unan específicamente con cualquier molécula con carácter antigénico. Este fenómeno es de gran utilidad en bioquímica, biología molecular y medicina (García, 2011).

Los investigadores Niels K. Jerne, Georges Köhler y Cesar Milstein, describieron la técnica que permitía el cultivo de “hibridomas” o células híbridas de linfocitos B con células plasmáticas

tumorales de mieloma múltiple. Con esta fusión de dos células, una programada para producir un anticuerpo específico pero que no se multiplica indefinidamente (linfocito) y otra inmortal, con gran capacidad de crecimiento, pero que no produce inmunoglobulina (célula de mieloma), se combina la información genética necesaria para la síntesis del anticuerpo deseado y una capacidad de síntesis proteica, permitiendo su multiplicación indefinida tanto *in vitro* como *in vivo*. Por esta aportación a la ciencia estos tres investigadores recibieron el premio Nobel de Medicina en 1984. Estas células fusionadas híbridas, (hibridomas) pueden multiplicarse rápida e indefinidamente y pueden producir anticuerpos. Los hibridomas son cultivados para obtener diferentes y determinadas colonias, las cuales producen sólo un tipo de anticuerpo. Los anticuerpos de diferentes colonias son analizados para conocer su capacidad de unirse a un antígeno determinado (Köhler y Milstein, 1975).

El proceso de producción de anticuerpos monoclonales es complejo. Primero se disgrega el bazo del ratón inmunizado, donde se acumulan los linfocitos B que tienen una escasa viabilidad en cultivo, y se fusionan con células de mieloma deficientes en enzimas implicadas en la síntesis del nuevo ADN como la timidina quinasa (TK) o la hipoxantina guanina fosforibosil transferas (HGPRT). Los productos de la fusión celular (Hibridomas) son cultivados en medio HAT (de hipoxantina, aminopterina y timidina) donde las células mielómicas son eliminadas. Tan sólo las células producto de la fusión entre un linfocito y una célula de mieloma son capaces de crecer en medio HAT (Kindt y col., 2007). Las células híbridas obtenidas tras el proceso de fusión contienen un número elevado de cromosomas (72 del mieloma y 40 del linfocito B) que en las sucesivas divisiones celulares se irán perdiendo hasta oscilar entre los 70 y los 80 cromosomas. Como consecuencia de dicho proceso, algunas células pierden la capacidad de secreción de anticuerpos o bien funciones básicas para la viabilidad celular. Por ello, tan pronto como se identifica una célula con capacidad productiva de interés, en un pocillo, se somete a un proceso de clonación para evitar el crecimiento de células no productoras que al ser metabólicamente más eficientes acabarían por dominar el cultivo.

En el año 2020, los anticuerpos monoclonales cumplen 40 años desde su invención dejando de ser una curiosidad biológica para ser una forma de tratamiento y diagnóstico muy importante en diversas enfermedades. Dentro del uso clínico se han aprobado cerca de 29 anticuerpos monoclonales para uso terapéutico o diagnóstico por la FDA (Machado y col., 2006). Muy importante para tratamientos de distintas enfermedades como artritis reumatoide, distintos cánceres, enfermedad de Crohn, etc.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos mediante cultivos celulares (*in vitro*) o utilizando animales experimentales (*in vivo*). El rendimiento en cultivo de los hibridomas no es muy alto y por ello se ha desarrollado la técnica de producción *in vivo* de ascitis en ratones mediante la inyección intraperitoneal de los hibridomas, método no aceptado en todos los países por cuestiones éticas relacionadas con el tratamiento de animales como biomodelos experimentales (Maldonado, 2016). Como alternativa se utilizan los procedimientos *in vitro* mediante la fermentación de cultivos de células de mamífero, utilizando biorreactores y sistemas de cultivo de perfusión continua (García, 2011).

➤ **Producción de AcM *in vivo*.**

La tecnología de producción *in vivo* consiste en inocular las células de un Hibridoma en la cavidad peritoneal de ratones compatibles, originando tumores que sintetizan un líquido rico en anticuerpos llamado líquido ascítico murino (LAM). El tumor crece y se desarrolla, extrayendo mediante sucesivas punciones el líquido ascítico, hasta que el animal muere.

La técnica de cultivo *in vivo* tiene como ventajas fundamentales que no requiere servicios ingenieros de gran envergadura y el AcM se obtiene en concentraciones relativamente elevadas, por lo que reduce la probabilidad de pasos posteriores de concentración del producto.

Entre las principales desventajas que poseen los procesos basados en sistemas biológicos *in vivo* están: que son muy variables, dependen en gran medida de la manipulación humana, la materia prima tiende a ser portadora de agentes infecciosos (virus, micoplasmas, entre otros) potencialmente perjudiciales para la salud humana y de un alto perfil de impurezas como grasas, proteínas y otros anticuerpos, la tecnología tiene un techo de escalado limitado por la cantidad de ratones que pueden usarse simultáneamente en un lote y por el bajo rendimiento en volúmenes de un ratón ($\approx 2,5$ mL volumen total extraído), posee un nivel de automatización muy bajo y existen implicaciones éticas por el uso continuo de miles de ratones por lote, sometidos a altos niveles de estrés y finalmente la muerte (Soria, 2010; Esparraguera, 2006)

➤ **Producción de AcMs *in vitro*.**

Conjuntamente con el uso de la técnica de producción de AcM vía ascitis murina, se fueron desarrollando tecnologías de producción *in vitro* a medida que lo permitió la adaptación de la tecnología de fermentación clásica a los requerimientos de las células animales, y también debido al desarrollo de sistemas de producción novedosos.

La tecnología de producción *in vitro* consiste en un sistema formado por células mantenidas en un medio de cultivo y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas. De esta forma se aseguran su supervivencia y reproducción, manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el organismo hospedero. Este sistema de producción de AcM es una fermentación y se desarrolla en un biorreactor; el cual ha demostrado sus ventajas para imponerse en la actualidad sin que la producción de ascitis haya caído en total desuso (Hernández, 2014; Casado, 2017).

La tendencia actual en la selección de tecnologías para este fin, refleja el peso del componente bioético en el rechazo al uso de ratones para la producción de anticuerpos en líquido ascítico. Se reducen paulatinamente los casos que aprueban el empleo de ratones, sólo justificando la utilización de los mismos en la producción de AcM cuando se ha demostrado que los métodos *in vitro* desarrollados en la actualidad resultan inadecuados para la de interés (National Research Council, 1999).

2.3. Cultivo celular

Los cultivos celulares han propiciado una revolución tecnológica que pasa por la incorporación de las técnicas de ingeniería genética, el desarrollo de reactores para cultivos masivos, la producción de vacunas virales, el cultivo en microcarriers, el desarrollo de nuevas superficies de cultivo en monocapa de alta adherencia, sustitutos de suero, robotización de las manipulaciones de cultivo, etc.

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el aislamiento de un tipo específico de células provenientes de órganos específicos o linajes celulares, su supervivencia y/o multiplicación “in vitro”, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Una de estas propiedades es la capacidad de adherencia a superficies, lo que permite que las células crezcan ya sea en monocapas o en suspensión (Tavira y col., 2009).

En la actualidad, entre las áreas de aplicación en las que el cultivo celular *in vitro* es una herramienta básica, cabe destacar:

- El estudio del cancer que se puede considerar como una enfermedad del ciclo celular. Los defectos en el control del ciclo pueden conducir a una proliferación celular anormal o a alteraciones cromosómicas como las que se observan en las células cancerosas. Se están estudiando las relaciones entre la regulación del ciclo celular y el cáncer, así como el papel específico de dos tipos de genes, los oncogenes y los genes supresores de tumores, presentes en las células normales, y cuyas alteraciones pueden conducir precisamente a la aparición del cáncer.
- La reproducción y diferenciación celular. Sus aplicaciones se refieren, de una parte, a la llamada “reproducción asistida” y al controvertido tema de la clonación y, de otra, a la Medicina Regenerativa en la que, a partir de células madre o troncales, se forman o reconstruyen tejidos que sustituyen a otros dañados por diversos procesos patológicos.
- La medicina regenerativa, que pretende conseguir la regeneración, total o parcial, de los tejidos que han perdido masa celular, utilizando técnicas de trasplante celular para implantar células troncales o células madre.

Ejemplo de áreas de investigación fuertemente dependientes de las técnicas de cultivo celular son:

- Virología: establecimiento de condiciones de cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas antivirales.
- Investigación del Cáncer.
- Inmunología. en la producción de anticuerpos monoclonales, gracias especialmente a la introducción de las técnicas de fusión celular, así como en el análisis de la genética de la célula somática.
- Ingeniería de proteínas. Por la producción de proteínas en líneas celulares: interferón, insulina, hormona de crecimiento.
- Estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo. Comprende el estudio de los receptores y de las vías de translocación de la señal.

- Aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad.
- Aplicaciones médicas: mantenimiento y producción de tejidos para trasplante.
- Aplicaciones industriales y agronómicas: producción por reproducción "in vitro" de clones de plantas de interés comercial.

Los cultivos celulares tienen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo tienen desventajas que hay que tener en consideración (Santacruz y col. 2017). Como ventajas podemos citar:

- ✓ **Permiten un control preciso y fino del medio ambiente.** En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial...), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular...).

Esto es cierto completamente sólo para algunas líneas celulares para las que se han definido los denominados medios definidos. Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman, y la concentración exacta en que se encuentran. Establecer un medio definido supone conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo, en muchas líneas no se han llegado a establecer medios definidos. En estos casos se trata de medios que se suplementan con soluciones complejas (suero, extractos de embrión, etc....) en los que se encuentran factores hormonales y nutritivos imprescindibles para el mantenimiento del cultivo, pero cuya naturaleza se desconoce. Estas soluciones complejas están sujetas a variación de lote a lote.

- ✓ **Caracterización y homogeneidad de la muestra.** Las células en cultivo de una línea celular (cultivo primario propagado), o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación.
- ✓ **Economía.** Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en animal completo. Es diferente el coste de investigación de un nuevo fármaco para la empresa farmacéutica que está desarrollando moléculas si ha de sintetizar de cada una de las que ha de probar en cantidades del orden del gramo (para el estudio en animales) a que baste con pocos miligramos.
- ✓ **Motivaciones éticas.** La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo 'in vivo' pero es una alternativa válida en muchas situaciones. Incluso un cultivo celular primario permite realizar experimentos que suponen el sacrificio de uno o pocos animales, pero con ellos se pueden ensayar un número de condiciones experimentales que pueden suponer si el estudio se hace con animales de experimentación el sacrificio de decenas o cientos.

Cuando se establece el cultivo, las células se diferencian, y entre otras cosas se hacen móviles e inician su proliferación. Esta diferenciación puede, en algunos casos ser revertida por procedimientos de diferenciación inducida por hormonas, confluencia, inductores químicos (ej. ésteres de forbol) pero no está claro si el estado rediferenciado es equivalente al estado de diferenciación *in vivo*.

2.4. Sistemas y Modos de cultivo celular.

En el cultivo de células animales se emplean diferentes sistemas para el crecimiento celular, en función de la capacidad de las células de crecer en forma dependiente o independiente de una superficie (denominada *sustrato*), es decir, adheridas o en suspensión.

2.4.1. Sistemas adherentes

Para el crecimiento de las células adherentes se emplean numerosos soportes, entre los que se encuentran:

- * **Placas de cultivo:** placas de poliestireno con un número variable de pozos, de diferente superficie, para el cultivo celular en microescala (volumen máximo de cultivo = 5 ml).
- * **Frascos T:** frascos de poliestireno que proveen una muy alta relación superficie: volumen. Los más utilizados poseen una superficie útil de crecimiento de 25 cm², 75 cm² y 150 cm².
- * **Microcarriers:** son soportes poliméricos relativamente cilíndricos, lisos o porosos, que permiten el desarrollo de células adheridas a su superficie. Se utilizan principalmente en biorreactores agitados, que los mantienen en suspensión (volumen máximo de cultivo = 10.000 l).

2.4.2. Sistemas en suspensión

Los sistemas de cultivo en suspensión requieren que las células sean previamente adaptadas al crecimiento en estas condiciones; es decir, éstas deben perder su adhesión al sustrato y replicarse en un cultivo en agitación continua.

- * **Frascos Roller o Rotatorios:** frascos cilíndricos sobre cuya superficie interna crecen las células. Requieren de una cámara de cultivo especial en la cual son posicionados horizontalmente, permitiendo su rotación a velocidades variables con el fin de bañar completamente las células con medio de cultivo.

Los frascos rotatorios (p. ej., *CellMaster*, de *Greiner BioOne* y de *Thermo Scientific*) han demostrado ser una solución sólida para el cultivo celular adherente y en suspensión. Se han utilizado tanto para producir células como para recoger el medio de cultivo en el que las células en crecimiento han expresado moléculas objetivo (*Kunitake y col. 1997*). Tales éxitos son una consecuencia del uso mejorado del medio combinado con un aumento en el área de superficie de cultivo en un dispositivo fácil de manejar. La transferencia de gas es extremadamente eficiente en botellas de rodillos debido a su alto coeficiente de transferencia de masa, que resulta de una

gran área de contacto entre la fase gaseosa y una película delgada de medio líquido en la pared de cada botella. Aunque ampliar las botellas rodantes es un enfoque generalizado en la industria biofarmacéutica, no parece ser un enfoque óptimo. La estrategia es tan simple como usar más botellas según sea necesario.

* **Frascos agitados tipo *Spinner*:** Estos frascos de vidrio borosilicato son agitados magnéticamente, ya sea mediante un péndulo o una pequeña hélice con una pequeña pieza metálica en su interior, sujetos a la tapa. Estos frascos se posicionan en una placa agitadora que posee un imán que gira a una velocidad definida, variable, y que permite así una agitación suave y homogénea del cultivo, tanto vertical como horizontalmente, minimizando las fuerzas de corte.

* **Biorreactores:** En general, los biorreactores se clasifican en dos grandes categorías: los biorreactores para células en suspensión (tipo tanque agitado y tipo *airlift*) y los biorreactores para células inmovilizadas (*microcarriers*, de fibra hueca, de membrana, de entrapamiento en perlas de agarosa o alginato, de espuma de poliuretano, de matriz cerámica, etc.).

2.4.3. Modos de Cultivo celular.

Una variable muy importante que debe ser considerada en el momento de definir un proceso productivo es el modo de operación del biorreactor; es decir, la producción en cultivos por lote (cultivos *batch*), por lote alimentado (*fed-batch*), cultivos continuos tradicionales (tipo quimiostato), o cultivos continuos con retención de células (con perfusión de medio de cultivo fresco). La elección depende de distintas variables, especialmente económicas. Las principales características de cada sistema se describen a continuación (**Fig. 5**) (*Didier y col., 2008*).

En cuanto a las concentraciones celulares alcanzadas se encuentran en extremos opuestos el modo “batch” y el modo perfusión (**Fig. 6**). El cultivo por lote y el cultivo continuo son los utilizados con mayor periodicidad en los estudios de investigación y desarrollo de procesos. El primero es el más simple de aplicar y permite obtener resultados experimentales con gran actividad y eficiencia debido a su corta duración y bajo costo (*Arathoon y Birch, 1985*). El segundo resulta muy útil para la caracterización celular pues permite crear un ambiente de constancia en la mayor parte de los parámetros relevantes de proceso que garantizan el establecimiento de estados fisiológicos definidos (*Vits y Hu, 1992*).

- * **Discontinuo (*batch*):** por lotes o tandas, sin alimentación; se coloca dentro del biorreactor la carga total de cada proceso (tanda o lote) de cultivo o fermentación y se deja que se lleve a cabo el proceso productivo o la fermentación por el tiempo que sea necesario; el cual se denomina tiempo de retención.
- * **Semicontinuo (*fed-batch*):** por lotes alimentados, con alimentación de entrada; se alimenta una línea de entrada o alimentación para que el sistema de cultivo tenga un producto (biomasa) con máximo de crecimiento (exponencial) y aumente la productividad.

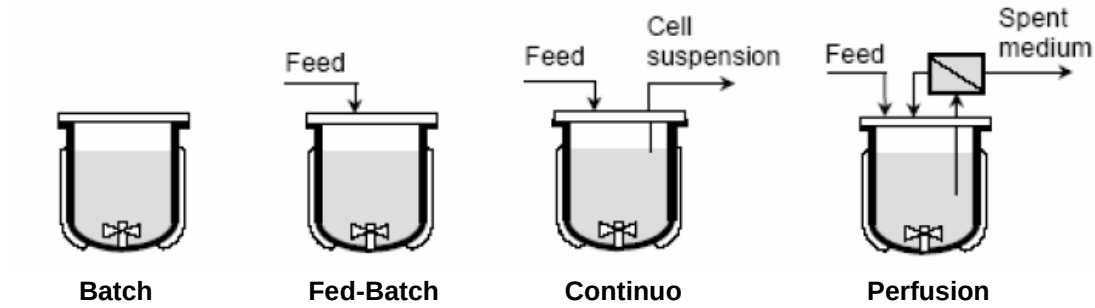


Figura 5. Distintos modos de operación de los biorreactores. Tomado de Chico, 2007.

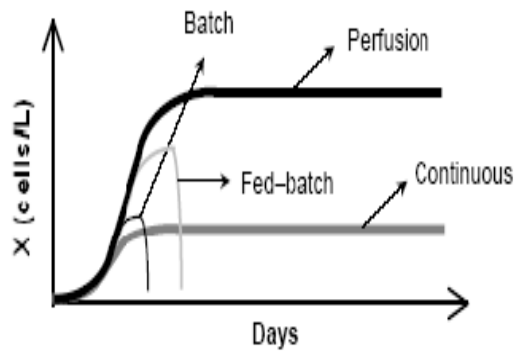


Figura 6. Características de cada modo de operación en cuanto a concentración celular y extensión de la corrida. Tomado de Chico, 2007.

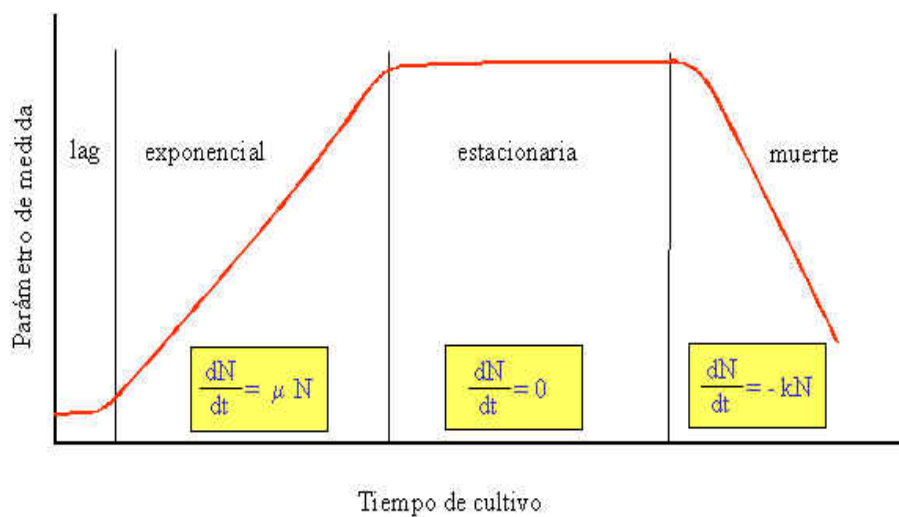


Figura 7. Fases de la curva de crecimiento. Tomado de <http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/20046/fichero/Anexo%252FANEXO+6.pdf>

- * **Continuo (continuos):** por quimioestato, se alimenta una línea de entrada o alimentación y se drena una línea de salida o lavado; de manera que los flujos o caudales de ambas líneas sean iguales y la producción sea continua (*Didier y col., 2008*).
- * **Perfusión (perfusion):** La operación en perfusión consiste en la alimentación continua de medio fresco y su consecuente cosecha para mantener un volumen de trabajo constante. Como consecuencia, el tiempo de corrida se extiende considerablemente con respecto al modo batch, como mínimo a 30 días, con viabilidades superiores a 70%. Para lograr la retención celular en tanque agitado se utilizan diversos aditamentos, siendo el “spin filter” de los más empleados (*Avgerinos, 1998; Dowd, 2003; Vallez-Cheteanu, 2006*). Como la pérdida de biomasa en la corriente de cosecha es mínima, se alcanzan concentraciones celulares superiores a 10^7 cel/mL. Esta es una de las razones que hacen que las corridas en perfusión sean las más difíciles de controlar.

2.4.4. Crecimiento celular y variables críticas.

➤ **Cinética de crecimiento celular**

Cuando se estudia el comportamiento cinético de un sistema es necesario entender como las concentraciones de los componentes representativos del mismo (substratos celulares, productos y subproductos) varían con el tiempo. La cinética se obtiene determinando experimentalmente la concentración de cada componente deseado en diferentes tiempos del proceso de fermentación (*Nuñez, 2014*). En un experimento cinético existen diferentes fases claramente identificables (**Fig. 7**).

- * **Fase de adaptación o latencia:**

Se produce rápidamente seguida de la inoculación. La célula se adecua al nuevo entorno de cultivo, se produce un aumento de tamaño de la célula sin división. Esta es una fase no productiva, por lo que su duración afecta negativamente la productividad del proceso. En esta fase la velocidad específica de crecimiento es prácticamente nula.

- * **Fase exponencial o logarítmica:** La concentración celular del cultivo aumenta a la máxima velocidad específica de crecimiento (μ). La concentración de todos los nutrientes y productos son muy favorables para el crecimiento. Esta es una de las etapas más importantes del crecimiento desde el punto de vista tecnológico, ya que el cultivo se expande a su máxima velocidad específica de crecimiento. Al graficar el aumento de la concentración celular durante esta fase en forma logarítmica, se observa un aumento lineal de la concentración celular, cuya pendiente corresponde al valor máximo y constante de la velocidad específica de crecimiento.

- * **Fase de aceleración negativa:** En esta fase constituye una frontera entre la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria. En la misma continúa el crecimiento del cultivo, pero la velocidad específica disminuye respecto a la fase logarítmica. También se conoce como fase de limitación. Esta fase se alcanza debido a que los valores de concentración de nutrientes y de desechos tóxicos han variado con respecto a la fase logarítmica y comienzan a incidir en el metabolismo celular.

* **Fase estacionaria:** La concentración de células vivas se mantiene relativamente constante debido a que la velocidad de división celular es contrarrestada por el aumento de la velocidad de muerte celular. Esto se debe a que para este intervalo de tiempo los nutrientes han sido consumidos y sus concentraciones han disminuido a valores estresantes para la célula. De igual manera los metabolitos de desecho excretados por las células han aumentado su concentración. Este ambiente tiene un efecto tóxico y a la vez limitante para la división celular.

* **Fase de muerte:** Por último, las condiciones del cultivo se han vuelto más agresivas, las reservas de energía del medio de cultivo están exhaustas, la velocidad de muerte supera a la velocidad de crecimiento, y la concentración de células vivas disminuye, llegando a ser superada por la concentración de células muertas, por lo que se observa una caída progresiva de la viabilidad del cultivo (Nuñez, 2014).

➤ **Variables críticas del crecimiento celular**

Los resultados del comportamiento cinético de una línea celular están íntimamente relacionados con el comportamiento de los parámetros de operaciones establecidos, por lo que estos constituyen variables críticas de los procesos fermentativos y deben establecer valores o intervalos óptimos para el proceso. Entre estas variables se encuentran:

* **Temperatura:** La temperatura es una de las variables críticas más importantes en la cinética de crecimiento del cultivo (García, 2004). Las células que progresan a una temperatura menor que la óptima tienen un crecimiento lento y por ende puede verse reducida la productividad global del proceso. Si la temperatura es demasiado alta, pero no mortal, se puede provocar una respuesta de estrés al choque térmico con la consecuente producción de proteasas celulares que causan un descenso en el rendimiento de los productos proteicos. La fermentación con hibridomas y mielomas transfectados se realizan generalmente a una temperatura de 37 °C bajo un control riguroso que evite variaciones superiores a 1 °C.

* **pH:** La mayoría de las células crecen a valores de pH cercanos a la neutralidad (pH 7,0). El efecto del pH es significativo sobre el crecimiento celular en un fermentador. Los metabolitos celulares liberados al medio como desechos metabólicos pueden originar un cambio del pH del medio de cultivo, por lo que hay que tener en cuenta su control mientras se desarrolle el proceso de fermentación. En los procesos fermentativos con células de mamíferos, usualmente valores de pH por encima de los deseados son controlados mediante el aumento de CO₂ presente en la mezcla de gases entrantes por el sistema de aireación, y si se desea incrementar el pH del cultivo, generalmente se suplementa una solución relativamente diluida de hidróxido de sodio.

* **La velocidad específica de crecimiento:** La velocidad específica de crecimiento (μ): es una medida del comportamiento del medio de cultivo en la fermentación y depende de las distintas fases de crecimiento. El control μ es una guía para la toma de decisiones en un proceso de fermentación; dependiendo de los distintos factores estudiados **Ecuación 1.**

$$\mu(t) = \mu(S) \mu(X) \mu(pH) \mu(T) \mu(P) \dots \dots \dots Ec. 1$$

Dónde: **S:** concentración de sustrato, **X:** concentración celular, **pH,** **T:** temperatura y **P:** concentración del producto.

Hay que tener en cuenta que μ óptimo para la formación de productos a altas densidades celulares debe ser entre 0,1 y 0,2 h⁻¹ (Martínez, 2005). En el caso del cultivo de células animales se ha visto que las velocidades de crecimiento ideal en un cultivo por lote son de 0,02 a 0,04 h⁻¹ (Chico, 2007); además, con un tiempo de duplicación celular de 20 a 40 h.

* **Agitación:** La agitación es la operación que facilita el contacto entre dos o varias fases. La fermentación celular es considerada como un sistema de tres fases, que implica reacciones líquido-sólido, gas-sólido y gas-líquido. La fase líquida contiene sales disueltas, sustratos y metabolitos. La fase sólida consiste en células individuales, sustratos insolubles o productos del metabolismo que precipitan y la fase gaseosa proporciona un reservorio para el suministro de oxígeno, para la eliminación de CO₂ o para el ajuste de pH. La agitación garantiza la homogeneidad del cultivo, evitando la deposición de las células por sedimentación y eliminando los gradientes de concentración de nutrientes y desechos en el entorno de las células. No obstante, la agitación excesiva puede dañar las células lo que origina un declive en la viabilidad celular. Además, a valores altos de agitación se producen transformaciones metabólicas que lleven a una variación en el gasto de nutrientes y el crecimiento celular (Figueredo, 2002). Por consiguiente, se debe alcanzar un balance entre la necesidad del mezclado y la necesidad de impedir el daño celular.

2.5. Medios de cultivo para células superiores.

El surgimiento de los medios de cultivo para células superiores (tejidos, células de mamíferos, fragmentos de órganos) comenzó cuando en 1882, con la solución de Ringer (Ringer, 1882; Ringer, 1883). Se dice que esta es el primer intento de cultivo in vitro de tejido animal. Después del éxito de la solución de Sydney Ringer, medio siglo después, en 1907 Ross G. Harrison supervisó con éxito una aparente extensión de fibras nerviosas de una rana durante varias semanas en el líquido linfático que había sido extraído recientemente de los sacos linfáticos de una rana adulta (Harrison y col., 1907). Se considera que este experimento es el comienzo del cultivo de células animales.

La comunidad científica en su mayoría coincide en que un medio de cultivo es el factor más importante en la tecnología de cultivo celular. Un medio respalda la supervivencia y proliferación celular, así como las funciones celulares; lo que significa que la calidad del medio afecta directamente los resultados de la investigación, la tasa de producción biofarmacéutica y los resultados del tratamiento de la tecnología de reproducción asistida.

Por lo tanto, es esencial para los investigadores que trabajan con cultivos celulares seleccionar un medio apropiado que sea adecuado para sus objetivos. En algunos casos, los investigadores deberían modificar un medio ellos mismos. Además, cuando enfrentan problemas, los investigadores deben conocer las propiedades del medio para identificar la causa de cualquier problema con sus experimentos (Yao y Asayama, 2017).

Actualmente, las formulaciones de medios populares para cultivo celular están disponibles comercialmente. Por lo tanto, hay investigadores que están utilizando medios de cultivo sin entender sus detalles y antecedentes, en particular con respecto a la justificación de su desarrollo,

los ingredientes exactos, así como los tipos de células para los que estos medios son adecuados (Yao y Asayama, 2017).

Las células animales pueden ser cultivadas utilizando un medio completamente natural o artificial/sintético junto con algunos productos naturales (**Tabla 2**).

*** Medios naturales**

Los medios naturales proceden de fluidos que existen naturalmente. Los medios naturales son muy útiles y convenientes para el cultivo de una amplia gama de células animales. La principal desventaja de los medios naturales es su baja reproducibilidad debido a la falta de conocimiento de su composición exacta.

*** Medios artificiales**

Los medios artificiales o sintéticos son preparados agregando nutrientes (tanto orgánicos como inorgánicos), vitaminas, sales, fases gaseosas de O_2 y CO_2 , proteínas del suero, carbohidratos, cofactores. Diferentes medios artificiales han sido diseñados para servir a uno o más de los siguientes propósitos: supervivencia inmediata (solución balanceada de sales, con pH y presión osmótica específicos); supervivencia prolongada (solución balanceada de sales complementada con varias formulaciones de compuestos orgánicos y/o suero); crecimiento indefinido; funciones especializadas.

Si se tiene en cuenta la composición de los medios de cultivo para estos fines y la presencia de algún componente específico, los medios artificiales se agrupan en cuatro categorías. (<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>).

• Medios que contienen suero

El suero fetal bovino es el suplemento más común en los medios de cultivo de células animales. Se utiliza como un complemento de bajo costo para proveer un medio de cultivo óptimo. El suero provee portadores o quelantes de nutrientes lábiles o insolubles en agua, hormonas y factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, y se une y neutraliza sustancias tóxicas.

• Medios libres de suero

La presencia de suero en el medio tiene varias desventajas y puede llevar a serias malinterpretaciones en estudios inmunológicos. Se han desarrollado varios medios libres de suero. Estos medios en general han sido diseñados específicamente para el cultivo de un tipo celular en particular e incorporan cantidades definidas de factores de crecimiento purificados, lipoproteínas, y otras proteínas, las cuales de otra manera serían provistas por el suero. Estos medios también son conocidos como “medios de cultivo definidos” ya que sus componentes son conocidos.

• Medios químicamente definidos

Estos medios contienen ingredientes orgánicos e inorgánicos ultra puros libres de contaminación, y pueden contener también aditivos proteicos puros, como factores de crecimiento. Sus componentes son producidos mediante ingeniería genética en bacterias o levaduras con la adición de vitaminas, colesterol, aminoácidos específicos y ácidos grasos.

Tabla 2. *Tipos de medios de cultivo para células animales.*

	Tipo de medio	Ejemplos	Uses
Medios naturales	Fluidos biológicos	plasma, suero, linfa, suero de cordón umbilical humano, fluido amniótico	
	Extractos de tejidos	Extracto de hígado, bazo, tumores, leucocitos y médula ósea, extracto de embrión de vaca o de pollo	
	Coágulos	coagulantes o coágulos de plasma	
Medios artificiales	Soluciones salinas balanceadas	PBS, DPBS, HBSS, EBSS	Forma la base de medios complejos
	Medios basales	MEM DMEM	Cultivos primarios y diploides
	Medios complejos	RPMI-1640, IMDM	Mantiene una amplia gama de células de mamíferos

- **Medios libres de proteínas**

Los medios libres de proteínas no contienen ninguna proteína y sólo poseen componentes no proteicos. Comparados con los medios complementados con suero, los medios libres de proteínas promueven un crecimiento celular y una expresión proteica superior y facilitan la purificación subsiguiente de cualquier producto expresado. Formulaciones como MEM, RPMI-1640 no contienen proteínas y un suplemento proteico es provisto cuando sea requerido (<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>).

2.5.1. Componentes básicos del medio de cultivo.

Los medios de cultivo contienen una mezcla de aminoácidos, glucosa, sales, vitaminas, y otros nutrientes, y se encuentran disponibles comercialmente tanto en polvo como líquidos. Los requerimientos de estos componentes varían entre líneas celulares, y estas diferencias son en parte responsables del gran número de formulaciones de medios de cultivo. Cada componente tiene una función específica, como se describe más abajo:

- **Sistemas de tamponado**

La regulación del pH es crítica para establecer condiciones óptimas de cultivo y en general se logra mediante uno de los siguientes sistemas de tamponado:

El Sistema de tamponado natural, el CO₂ gaseoso se balancea con el contenido de CO₃/HCO₃ del medio de cultivo. Los cultivos con sistema natural de tamponado requieren ser mantenidos en una atmósfera con 5-10 % CO₂, generalmente mantenida por una incubadora de CO₂. El sistema de tamponado natural es de bajo costo y no tóxico.

El tamponado químico que utiliza un switterión, hepes, posee una capacidad de tamponado superior en el rango 7,2-7,4 y no requiere de una atmósfera gaseosa controlada. El hepes es relativamente costoso y tóxico para algunos tipos celulares a concentraciones más altas.

- **Indicadores**

La mayoría de los medios de cultivo disponibles comercialmente incluyen un indicador de pH, el cual permite la supervisión constante del pH. Uno de los más empleados en la actualidad es el rojo fenol. Durante el crecimiento celular el medio cambia de color mientras el pH cambia, debido a los metabolitos liberados por las células. A valores de pH bajos, el rojo de fenol torna el medio color amarillo, mientras que a valores de pH mayores torna el medio color púrpura. El medio es de color rojo brillante a pH 7,4, el valor óptimo para el cultivo celular.

Sin embargo, hay algunas desventajas asociadas al uso del rojo de fenol tal como se describe abajo:

- 1) el rojo fenol imita la acción de algunas hormonas esteroides, particularmente del estrógeno, por ende, es aconsejable utilizar medios sin rojo fenol en estudios con células sensibles al estrógeno como el tejido mamario.
- 2) la presencia del rojo fenol en algunas formulaciones libres de suero interfiere con la homeostasis del sodio y el potasio, este efecto puede ser neutralizado por la adición de suero o de hormona pituitaria bovina en el medio.

- 3) el rojo fenol interfiere con la detección en los estudios de citometría de flujo, por lo que se ha de tener en cuenta en dependencia de la técnica analítica usada.

▪ **Sales inorgánicas**

Las sales inorgánicas en el medio ayudan a retener el balance osmótico y ayudan a regular el potencial de membrana proveyendo iones de sodio, potasio y calcio.

▪ **Aminoácidos**

Los aminoácidos son los bloques de construcción de las proteínas, y por ende son ingredientes obligatorios de todos los medios de cultivo conocidos. Son requeridos para la proliferación celular y su concentración determina la máxima densidad celular alcanzable. Dentro de ellos se encuentran la glutamina, L-arginina, L-cisteína entre otros como histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, alanina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, , glicina, prolina, serina y tirosina.

La L-glutamina, un aminoácido esencial, es particularmente importante. La L-glutamina provee nitrógeno para el NAD, el NADPH y los nucleótidos y sirve como una fuente de energía secundaria para el metabolismo. La L-glutamina es un aminoácido inestable que, con el tiempo, se convierte en sustancias que no pueden ser utilizadas por las células, y por ende debe ser agregada al medio justo antes de su uso. Se debe tener precaución a la hora de agregar más L-glutamina que la determinada en la formulación original ya que su degradación resulta en la acumulación de amoníaco, y el amoníaco puede ser perjudicial para algunas líneas celulares. La concentración de L-glutamina para el cultivo de células de mamíferos puede variar entre 0,68 mM en el Medio, a 4 mM en el Medio de Eagle modificado por Dulbecco. Los medios de cultivo de células de invertebrados contienen tanto como 12,3 mM de L-glutamina. Suplementos como el glutamax son más estables y pueden reemplazar la glutamina en el cultivo prolongado de células de crecimiento lento.

También se pueden agregar aminoácidos no esenciales al medio de cultivo para reemplazar aquellos que han sido consumidos durante el crecimiento. La suplementación de los medios con aminoácidos no esenciales estimula el crecimiento y prolonga la viabilidad de las células.

▪ **Carbohidratos**

Los carbohidratos en la forma de azúcares son la principal fuente de energía. La mayoría de los medios contienen glucosa y galactosa, sin embargo, algunos contienen maltosa y fructosa.

▪ **Proteínas y péptidos**

Las proteínas y péptidos utilizados con mayor frecuencia son la albúmina, la transferrina y la fibronectina. Son particularmente importantes en medios libres de suero. La fibronectina es un componente clave en la adhesión celular; mientras que la transferrina es una proteína transportadora de hierro y actúa para proveer hierro a la membrana celular.

El suero es una fuente rica de proteínas e incluye albúmina, transferrina, aprotinina, fetuina y fibronectina. La albúmina es la proteína principal en la sangre actuando para unir agua, sales,

ácidos grasos libres, hormonas y vitaminas, y transportarlos entre tejidos y células. La capacidad de unión de la albúmina la convierte en apta para remover sustancias tóxicas de los medios de cultivo.

Otras proteínas tienen funciones específicas en los medios de cultivo. Por ejemplo, la aprotinina es un agente protector en los sistemas de cultivo, estable a pH neutro y ácido y resistente a altas temperaturas y a la degradación por enzimas proteolíticas. Tiene la habilidad de inhibir varias proteasas de serina tales como la tripsina. La fetuina es una glicoproteína que se encuentra en mayores concentraciones el suero fetal y de los recién nacidos que en el de los adultos y también es un inhibidor de proteasas de serina.

- **Ácidos grasos y lípidos**

Son particularmente importantes en los medios libres de suero ya que generalmente se encuentran presentes en el suero. Constituyen fuentes energéticas y de componentes de membranas.

- **Vitaminas**

Muchas vitaminas son esenciales para el crecimiento y la proliferación de las células. Las vitaminas no pueden ser sintetizadas en cantidades suficientes por las células y por ende son suplementos importantes requeridos en los tejidos. Nuevamente, el suero es la principal fuente de vitaminas en los cultivos celulares, sin embargo, los medios también se encuentran enriquecidos en diferentes vitaminas, haciéndolos apropiados para una línea celular particular. Las vitaminas del grupo B son adicionadas por lo general para la estimulación del crecimiento.

- **Oligoelementos**

Los medios libres de suero suelen ser suplementados con oligoelementos como el cobre, zinc, selenio y los intermediarios del ácido tricarboxílico. Estos son elementos químicos que se necesitan en pequeñas cantidades para el correcto crecimiento celular. Estos micronutrientes son esenciales para muchos procesos biológicos, por ejemplo, el mantenimiento de la funcionalidad de enzimas. (<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>).

- **Suplementos para medios**

Los medios completos de crecimiento recomendados para ciertas líneas celulares requieren de componentes adicionales que no se encuentran presentes en los medios basales ni en el suero. Si bien suplementos como hormonas, factores de crecimiento y sustancias de señalización son requeridos para el normal crecimiento de algunas líneas celulares, siempre hay que tener precauciones, la adición de suplementos puede alterar la osmolalidad del medio de cultivo completo, lo cual puede afectar negativamente el crecimiento de las células, por lo que siempre es mejor evaluar nuevamente este parámetro luego de agregar el suplemento.

La vida media del medio de cultivo cambia luego de la adición de suplementos. Los medios completos que contienen un complemento proteico suelen degradarse más rápido que el medio basal solo.

▪ **Antibióticos**

Si bien no son requeridos para el crecimiento celular, los antibióticos suelen utilizarse para controlar el crecimiento de contaminantes bacterianos y fúngicos. No se recomienda el uso rutinario de antibióticos para el cultivo celular ya que pueden enmascarar la contaminación por micoplasma y bacterias resistentes. Más aún, los antibióticos pueden interferir con el metabolismo de las células sensibles.

▪ **Suero en los medios**

El suero es una mezcla compleja y es uno de los componentes más importantes de los medios de cultivo celular. El suero provee los nutrientes básicos para las células (tanto en solución como unidos a proteínas).

- ✓ El suero provee varios factores de crecimiento y hormonas involucradas en la promoción del crecimiento y funciones celulares especializadas.
- ✓ Provee varias proteínas de unión como la albúmina, la transferrina, las cuales pueden transportar otras moléculas a la célula. Por ejemplo: la albúmina transporta lípidos, vitaminas, hormonas, etc. hasta las células. También provee proteínas, como la fibronectina, la cual promueve la adhesión celular al sustrato. También provee factores de extensión que ayudan a las células a extenderse antes de comenzar a dividirse.
- ✓ Provee inhibidores de proteasas que protegen a las células de la proteólisis.
- ✓ También provee vitaminas (particularmente vitaminas liposolubles como la A, D, E y K) y minerales (como Na⁺, K⁺, Zn²⁺, Fe²⁺).
- ✓ Aumenta la viscosidad del medio y, por ende, protege las células del daño mecánico durante la agitación de cultivos en suspensión.
- ✓ También actúa como tampón para regulación del pH.

El suero de ternero o feto bovino suele utilizarse preferentemente para propiciar el crecimiento de células en cultivo, por no estar expuesto a patógenos o virus. El suero fetal es una fuente rica en factores de crecimiento y es apropiado para el clonado celular y el crecimiento de células delicadas. El suero de ternero se utiliza en estudios de inhibición por contacto ya que promueve menos el crecimiento. Los medios de crecimiento normales suelen contener 2 a 10 % de suero:

Debido a la presencia tanto de factores de crecimiento como inhibidores, el rol del suero en el cultivo celular es muy complejo. Desafortunadamente, además de servir a varias funciones, el uso de suero en el cultivo de tejidos tiene varios inconvenientes. La **Tabla 3** muestra las ventajas y desventajas de utilizar suero en los medios. (<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>). La evolución de las formulaciones en los medios de cultivo, ha conducido al abaratamiento de los costos de producción, debido a la simplificación de los procesos de purificación al disminuir el perfil de impurezas presentes en el sobrenadante de cultivo. En el caso de los medios libres de Suero, también se logra una mayor reproducibilidad entre lotes de producción y se reducen los riesgos de transmisión de agentes infecciosos, logrando estimular la proliferación celular con resultados comparables a los obtenidos en medios suplementados con suero (*Invitrogen Corporations, 2001; LifeTechnologies, 2014*).

Tabla 3. *Ventajas y desventajas de utilizar Suero en los medios de cultivo para células superiores.*

Ventajas	Desventajas
El suero contiene varios factores de crecimiento y hormonas que estimulan el crecimiento y funciones celulares.	Falta de uniformidad en la composición del suero
Ayuda en la adhesión de las células	En necesario evaluarlo para mantener la calidad de cada lote previo a su uso
Actúa como un factor de extensión y funciona como proteína de unión	Puede contener alguno de los factores de inhibición
Actúa como agente tampón el cual ayuda a mantener el pH del medio de cultivo	Aumenta el riesgo de contaminación
Minimiza los daños mecánicos causados por viscosidad	La presencia de suero en el medio puede interferir con la purificación y el aislamiento de productos del cultivo celular

2.5.1. Optimización de medios de cultivos.

Existen en la literatura diferentes ejemplos sobre técnicas que hacen posible la optimización de los medios para servir de referencia para realizar un balance de materiales apropiado. Esto puede ser un punto de partida para la formulación y optimización de un medio de cultivo en particular, pero no suficiente ya que el crecimiento celular tiene implícito otros factores que determinan la estequiometría del mismo (Gutierrez y Vara, 2008).

La optimización de los medios de cultivo con fines industriales, en la mayoría de los casos ha sido efectuada mediante procedimientos empíricos de ensayo y error, no sólo en la formulación del medio de cultivo sino también en las condiciones de operación. De cualquier manera, es probable que el medio de cultivo original pueda ser optimizado modificando el porcentaje de los componentes del medio y las materias primas utilizadas, siendo factible en muchos casos optimizar un medio de tal manera que no sea solamente más productivo, sino de menor o igual costo que el original, para lo cual se requiere del uso de varios métodos de optimización (Maddox y Richert, 1977).

La metodología más elemental para la optimización de medios de cultivo consiste en realizar experimentos en los que se varía la concentración del componente a ensayar manteniéndose constante las concentraciones de los demás ingredientes. Para organismos aerobios generalmente se utiliza un sistema de cultivo en erlenmeyers agitados. En este caso, se analiza el efecto de la variable escogida sobre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa obtenida. Si bien este procedimiento es simple, es evidente que hace falta una gran cantidad de trabajo preliminar ya que el operador no conoce de antemano qué nutriente es el limitante del crecimiento. Cuando son varios los posibles nutrientes limitantes el método resulta poco práctico. Por otra parte, puede ocurrir que la respuesta obtenida al variar la concentración de un componente dependa de los niveles de los otros, o sea, se produzca interacción entre componentes. Se puede mejorar mucho la optimización en batch empleando técnicas estadísticas o utilizando sistemas continuos con pulsos de componentes (Dreyer y col., 2000).

Un aspecto relevante en la optimización de un medio de cultivo de interés industrial no es sólo el logro de una formulación racional del medio, sino también la posible inclusión de materia prima de bajo costo que haga rentable el proceso (Barrios, 2014).

2.5.2. Adaptación a los medios de cultivo.

En literaturas se reportan dos métodos experimentales para la adaptación de las células a medios libres de suero o proteínas (Cruz y col., 1998; Mateo y col., 1997; Schröder y Matischak, 2004).

El primero, y cuya aplicación resulta la práctica más divulgada, es la adaptación secuencial. Este consiste en disminuir gradualmente el contenido del medio suplementado con suero, sustituyéndolo paulatinamente por medio libre de suero a medida que se efectúan pases de cultivo y se verifica que las células soportaron la disminución previa del medio suplementado.

El segundo método es la adaptación directa, la cual consiste en eliminar de una vez la el medio no deseado por un nuevo medio de cultivo. El reemplazo de una formulación de medio por la otra se lleva a efecto “de un golpe” una vez que el cultivo original se encuentra en fase de crecimiento exponencial y con elevada viabilidad. Este método tiene la ventaja de que el objetivo se alcanza mucho más rápido, pero casi nunca los resultados son favorables.

Se ha reportado que en la adaptación de células de mamíferos a un medio libre de suero juega un papel importante la presencia de factores de crecimiento producidos por las propias células y liberados por la membrana citoplasmática, los cuales tienen efectos autocrinos y paracrinos al interactuar con los receptores específicos en la membrana celular, lo que desencadena diversos mecanismos de señalización intracelular que inciden en la expresión genética y promueven la división celular (Teige y col., 1994; Takeuchi y col., 2004; Arrieta y Sotelo, 2005).

La selección de un método de adaptación u otro obedece al balance entre las ventajas/desventajas de cada uno. También se señala, además, se debe tener en cuenta al terminar una adaptación celular a un medio de cultivo específico, la comprobación de que el proceso no provocó pérdidas en la capacidad de expresión del producto de interés sobre la población resultante, ya que casos como este han sido reportados en la literatura (Cruz y col., 1998).

2.5.3. Métodos para incrementar la productividad volumétrica.

La relación directa entre la acumulación de biomasa y la velocidad específica de producción con la productividad, hace de estos dos factores las principales dianas para el incremento productivo.

Los métodos estimuladores de la productividad se pueden agrupar en dos grandes grupos: aquellos que tienen como objetivo aumentar la integral de células viables en el tiempo al incrementar la concentración máxima de células y mantener altas viabilidades en el cultivo; y aquellos dirigidos a elevar la velocidad específica de producción de las células (Boggiano y col., 2015).

En estudios realizados por Kiehl y col., 2011 se evidencia un incremento de la productividad al aumentar la osmolaridad. Los resultados obtenidos muestran que las células de mamífero cultivadas, por ejemplo, los hibridomas murinos o células de ovario de hámster chino (CHO) utilizadas para producir proteínas terapéuticas y de diagnóstico, a menudo presentan una mayor productividad específica bajo estrés osmótico principalmente con un aumento. En dicha investigación referida a la línea celular CHO se evidencia que un aumento de la osmolaridad incrementa la productividad y que rápidos aumentos de la presión osmótica resultan en una mayor productividad que los aumentos más graduales o incluso constantes. Sin embargo, provoca un arresto de la velocidad específica de crecimiento y la concentración de células vivas se mantiene estable en el tiempo, además se acompaña de una serie de cambios fisiológicos, incluyendo la variación del tamaño celular (Kiehl y col., 2011).

Otro parámetro de gran importancia y para lograr el aumento de la productividad es la temperatura. Se han realizado estudios con la línea celular CHO que han demostrado que una disminución de la temperatura (33.0 °C) incrementa hasta seis veces la velocidad de producción

comparada con el cultivo a 37.0 °C, aunque la velocidad específica de crecimiento disminuye en una proporción mayor. Se observa a partir de esto la reducción de la actividad metabólica celular y un aumento de la acidez del medio (Vergara y col., 2014).

También se ha determinado que existen aditivos químicos que al ser añadidos al medio de cultivo pueden estimular la expresión del producto. Diferentes autores dejan plasmado en sus artículos el empleo del acetato de sodio y el butirato de sodio (NaBut) como principales

El hierro es esencial para el proceso de crecimiento celular y juega un papel decisivo durante muchos procesos fisiológicos incluidos la respuesta inmune. En un estudio realizado en el año 1990 en Japón por Nozomu y col., para sustituir la transferrina de los medios de cultivo libre de suero para hibridomas, determinaron que el uso de citrato férrico en combinación con Selenio y etanolamina es el mejor suplemento para el crecimiento celular, que la propia transferrina con ciertas combinaciones (Eto y col., 1991).

Los seis suplementos *Thermo Scientific HyClone Cell Boost* brindan una selección única de categorías de nutrientes particulares como aminoácidos, vitaminas, lípidos, colesterol, glucosa y/o factores de crecimiento en complementos para múltiples tipos de células de mamíferos. Todos los suplementos de *HyClone Cell Boost* están definidos químicamente y no contienen componentes derivados de animales. Además de los productos *HyClone Cell Boost*, otros productos conocidos como suplementos proporcionan nutrientes identificados para aplicaciones específicas: como lípidos concentrados y colesterol, para líneas de células NS0 o metabolitos seleccionados, para células que utilizan el sistema de glutamina sintetasa (GS) (<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=17792>).

Históricamente se han realizado numerosos esfuerzos para reducir o eliminar el suero del medio de cultivo. Han surgido formulaciones basales enriquecidas con nutrientes proteicos de origen animal como la insulina, transferrina y otros péptidos o aminoácidos (Yee y col., 1989; Stewart y col., 1990). La insulina es un pequeño polipéptido de 5,7 kDa que es conocido por tener múltiples efectos en la fisiología celular, actúa como factor de crecimiento y mantenimiento en las células, incluyendo el transporte por la membrana, metabolismo de la glucosa y biosíntesis de ácidos nucleicos y ácidos grasos. Se presenta normalmente en el suero animal y suele añadirse como suplemento a los medios libre de suero a concentraciones que oscilan alrededor de 5-10 mg/mL (Butler, 2015).

2.6. Reactivos Hemoclasificadores.

2.6.1. Antígenos para identificación del Sistema ABO.

Las membranas de las células del organismo humano incluyendo los eritrocitos están formadas por varias capas de moléculas lipídicas, proteicas, y carbohidratos distribuidos en tal forma que permiten una separación entre el medio intracelular y el medio extracelular. Los carbohidratos se encuentran formando oligosacáridos y polisacáridos que en su mayor parte están ligados a lípidos y proteínas. Muchas de estas sustancias, es decir, glicolípidos y glicoproteínas tienen capacidad

antigénica y constituyen los llamados grupos sanguíneos. Estos antígenos de la membrana están determinados genéticamente.

Landsteiner en 1900 descubrió que los glóbulos rojos pueden clasificarse en A, B y O, de acuerdo a la presencia o ausencia de antígenos reactivos en la superficie de los glóbulos rojos. Este autor demostró que los glóbulos rojos contenían por lo menos dos factores designados como aglutinógenos A y B, con los cuales se podía explicar los cuatro grupos que existían y así postuló, que cada persona podía tener uno de ellos (A o B), ambos (AB) o ninguno (O) (Marcus, 1969; Coppo y Baez, 2010).

Los antígenos A y B son glicoproteínas, producidas por genes alélicos en un locus único localizado en el cromosoma 9, y se encuentran aparentemente adheridos a la membrana de los glóbulos rojos. La especificidad antigénica es conferida por el azúcar terminal: ej. azúcar N-acetilgalactosamina proporciona la especificidad antigénica A y el azúcar galactosa determina la actividad B (**Fig. 8**).

El descubrimiento del grupo ABO fue seguido del descubrimiento de los grupos MNP en 1918 y luego por el Rh en 1939 (Coppo y Baez, 2010). Estos antígenos pueden formar parte de la membrana del glóbulo rojo como es el antígeno Rh que es una lipoproteína, o estar adherido a la superficie de los glóbulos rojos como los antígenos ABO que químicamente son lipopolisacáridos.

Los antígenos ABO están presentes en todos los tejidos, excepto el sistema nervioso central, de donde se deduce la importancia de dicho sistema en la transfusión de eritrocitos, leucocitos, plaquetas y trasplantes de tejidos y también se encuentran presentes en las secreciones como polisacáridos solubles (Grispan, 1983). Como se describió, algunos antígenos sanguíneos están presentes en la mayoría de los tejidos y líquidos corporales (ej. ABO); y otros, como el Rh, K, están limitadas su presencia y formando parte de las membranas de los glóbulos rojos.

Estos antígenos pueden provocar una respuesta inmunológica en individuos que carecen de los mismos (Sapatnekar, 2015), al enfrentarse a estos determinantes antigénicos. En el caso de los grupos sanguíneos ABO, los individuos con grupo sanguíneo A, desarrollan una respuesta inmune a los antígenos tipo B de microorganismos y antígenos ambientales como las plantas que contienen estos epítomos (Milland y Sandrin, 2006). Los individuos del grupo sanguíneo B, desarrollan anticuerpos anti-A, los individuos del grupo sanguíneo O producen tanto anticuerpos anti-A como anti-B, mientras que los sujetos del grupo sanguíneo AB no tienen anti-A ni anti-B porque expresan ambos antígenos en sus glóbulos rojos (Wolfram y col., 2016).

El sistema ABO fue el primer grupo sanguíneo descubierto. Dichos antígenos son de mucha importancia en la transfusión sanguínea, trasplante de tejidos y enfermedad hemolítica del recién nacido. La compatibilidad de grupo ABO es esencial en toda prueba serológica pretransfusional. Además, existen antígenos propios de los leucocitos y plaquetas, pero estos generalmente no se consideran en lo que se refiere comúnmente como pruebas pre-transfusionales.

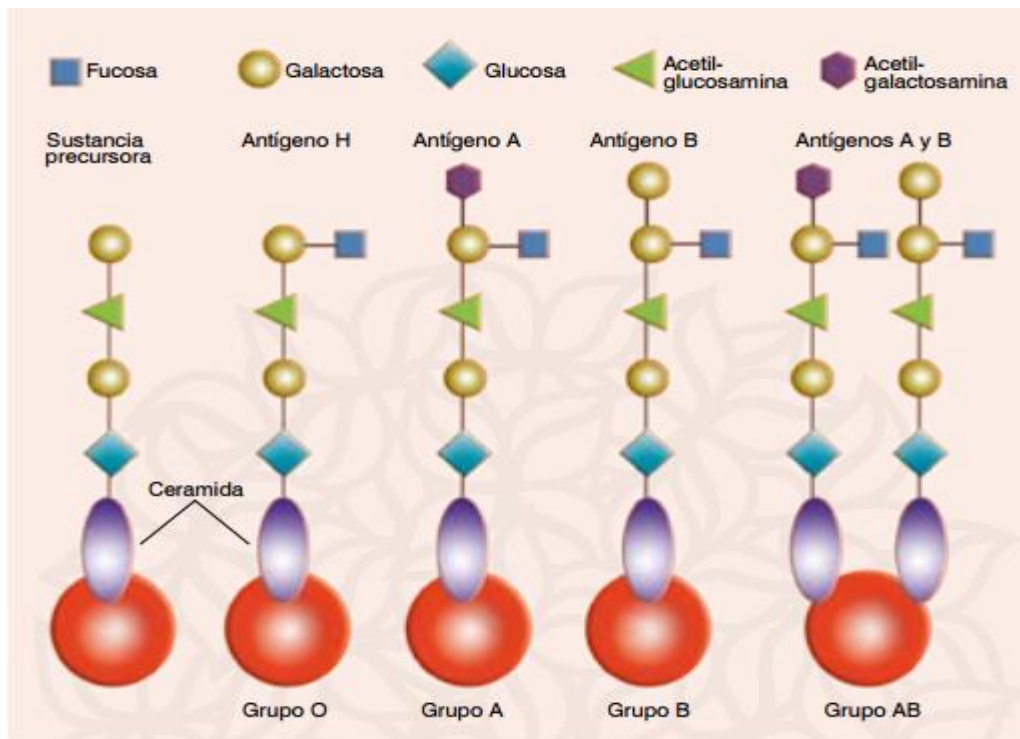


Figura 8. Estructura de las glicoproteínas que conforman los alelos O, A y B (Tomado de Arbeláez, 2009).

Hoy en día se conocen más de 15 sistemas de grupos sanguíneos, con distintas expresiones génicas como variantes dentro de cada sistema, la mayoría tiene 2 o 3 alelos, pero por ejemplo el Rh tiene por lo menos 28 alelos. Algunos de estos grupos se expresan en las personas de forma natural y otros pueden no existir del todo. Algunos se acompañan fisiológicamente con la presencia de anticuerpos naturales, otros sistemas solo se acompañan de anticuerpos cuando estos aparecen como resultado de transfusiones o isoimmunización (Arbeláez, 2009).

La mayoría de las pruebas serológicas en inmunohematología dependen de reacciones entre antígenos en los glóbulos rojos y anticuerpos en el suero. Los anticuerpos sanguíneos son usualmente IgG y/o IgM y en casos raros IgA. Las capacidades de fijar complementos por algunos anticuerpos son también importantes para el entendimiento de algunos fenómenos *in vitro* y *in vivo*. Usualmente los anticuerpos IgG tienen mayor significado clínico y en Enfermedad Hemolítica del recién nacido son los anticuerpos IgG los responsables de la enfermedad. Por otro lado, reacciones hemolíticas transfusionales causadas por anticuerpos IgM con fijación de complemento pueden causar hemólisis intravascular severa (ej. Incompatibilidad de grupo ABO) y reacciones transfusionales hemolíticas causadas por anticuerpos IgG pueden causar hemólisis extravascular y reacción menos severa (Ej. incompatibilidad Rh) (Grispan 1983).

2.6.2. Reacciones serológicas

Existen varios métodos *in vitro* para detectar reacciones de antígeno-anticuerpo, los más utilizados en serología de Banco de Sangre son: Aglutinación y Hemólisis.

➤ Aglutinación

La aglutinación de eritrocitos es el fenómeno *in vitro* más comúnmente utilizado en serología de Banco de Sangre. Para que se visualicen existen dos fases:

- 1) Sensibilización: en la cual el anticuerpo se adhiere físicamente al antígeno específico de la superficie de los glóbulos rojos (con o sin fijación de complemento) y no es visible.
- 2) Aglutinación de eritrocitos, visible *in vitro*, en el que se forman puentes o uniones entre eritrocitos sensibilizados.

Los fenómenos de sensibilización y aglutinación están influenciados por varios factores: la temperatura, que para la reacción óptima de anticuerpos varía (ej. IgG tiende a reaccionar mejor a 37°C e IgM a temperatura ambiente o temperaturas frías), pH, tiempo de incubación (necesario para que la reacción antígeno anticuerpo alcance un equilibrio), fuerza iónica del medio, etc. (Grispan 1983).

➤ Hemólisis

La hemólisis (eritrocátéresis) es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes). El eritrocito carece de núcleo y orgánulos, por lo que no puede repararse y muere cuando se desgasta. Este proceso está muy influenciado por la tonicidad del medio en el que se encuentran los eritrocitos. Por ejemplo, en una solución hipotónica con respecto al eritrocito, este pasa por un estado de turgencia (se hincha por el exceso de líquido) y luego esta célula estalla debido a la presión.

Esto genera una menor cantidad de células que transporten oxígeno al cuerpo, entre otros elementos como los anticuerpos. Aproximadamente un 85% de los eritrocitos se destruyen extravascularmente, es decir, sin liberar su hemoglobina al plasma. Se produce en el bazo y en menor medida en el hígado y la médula ósea. Se produce al final de la vida media de los

eritrocitos, aproximadamente a los 120 días (*Grispan 1983*). En determinadas situaciones patológicas hay un aumento de la destrucción de los eritrocitos intra- o extravascular, como consecuencia de: (*Grispan 1983*)

- ✓ Unión antígeno-anticuerpo (reacción transfusional, enfermedad hemolítica del recién nacido).
- ✓ Lesiones mecánicas (como en el fallo de las prótesis de válvula cardíaca).
- ✓ Trastornos osmóticos.
- ✓ Trastornos enzimáticos.
- ✓ Trastornos tóxicos por hemotoxinas.
- ✓ Alteraciones congénitas de los eritrocitos (en anomalías de la hemoglobina o en infecciones).
- ✓ Infecciones como la malaria.

Por su parte la hemólisis puede ser provocada por diferentes causas de manipulación a técnicas durante el protocolo:

- Exceso de velocidad de succión de la muestra.
- Uso de agujas, jeringas y/o recipientes húmedos.
- Vaciado inadecuado de la jeringa.
- Proporción inadecuada de anticoagulante.
- Mordedura de arañas de la familia Sicariidae y Latrodectus mactans.
- Mordedura de víboras y crótalos

2.6.3. Pruebas para determinar el grupo sanguíneo ABO (sistema ABO)

La prueba para la clasificación sanguínea de rutina se basa en una técnica de hemaglutinación. Se utilizan reactivos comerciales que contienen anticuerpos específicos para cada antígeno, que se mezclan con la sangre a clasificar. Después de mezclar una gota del reactivo con una gota de sangre, se observa la presencia de hemaglutinación (**Fig. 9**) (*Arbeláez, 2009*).

Las pruebas de rutina para determinar el grupo sanguíneo ABO deben hacerse en dos partes: primero buscando en los eritrocitos la presencia de antígenos A y/o B en la membrana (prueba globular o directa), y segundo, buscando en el suero o plasma los anticuerpos anti-A y/o anti-B que correspondería tener esa persona (prueba sérica o inversa). Por lo tanto, las pruebas globulares y las inversas se complementan y la una confirma la otra. Por ejemplo, si se encuentra antígeno A en los eritrocitos y anti-A en el suero del mismo paciente, es necesario repetir la prueba debido a una discrepancia sanguínea. Ambas pruebas deben hacerse en donantes y receptores, de rutina. Las dos circunstancias en las cuales no es necesario realizar ambas pruebas, son la confirmación del tipo ABO de la unidad del donante que ya ha sido previamente rotulada y la clasificación de niños menores de 4 meses de edad, en quienes todavía pueden no haberse desarrollado los anticuerpos completamente; en ambos casos, sólo se requiere la prueba globular o directa. En general, los anticuerpos ABO se detectan a temperatura ambiente, en solución salina y reaccionan de forma óptima a 4°C (*Malomgre y Neumeister, 2009*).

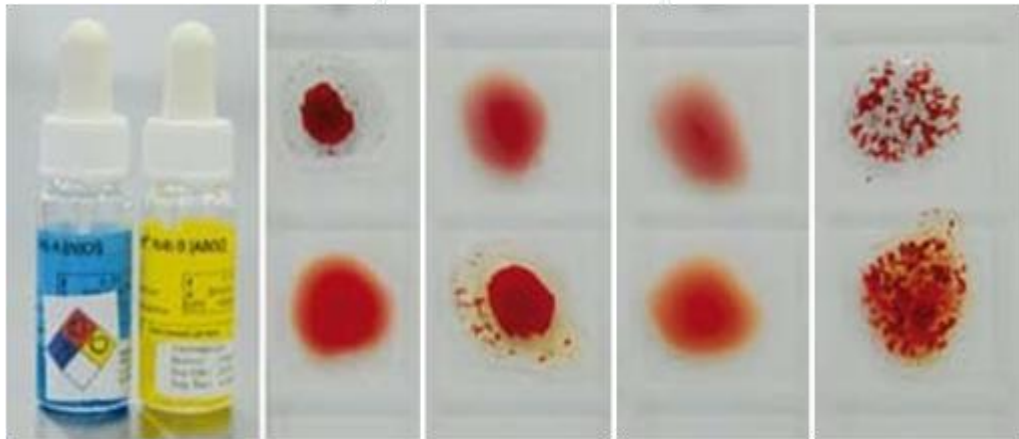


Figura 9. Hemoclasificación. Aglutinación de la sangre de acuerdo a los antígenos del sistema ABO presentes en la membrana de los eritrocitos. La aglutinación de los eritrocitos es un resultado positivo e indica la presencia del correspondiente antígeno. (Tomado de Arbeláez, 2009).

Los reactivos anti-A y anti-B aglutinan la mayoría de las células antígeno-positivas por contacto directo, aun sin centrifugación. Sin embargo, en el suero de algunas personas los anticuerpos anti-A y anti-B son muy débiles para aglutinar los eritrocitos sin centrifugación o sin incubación prolongada; por lo tanto, las pruebas séricas deben ser realizadas por un método eficiente que detecte hasta los anticuerpos débiles, como por ejemplo usando técnicas en tubo, microplato o de aglutinación en columna (*Malomgre y Neumeister, 2009*).

2.6.4. Importancia clínica del sistema sanguíneo ABO.

Los antígenos y anticuerpos que hacen parte del sistema sanguíneo ABO juegan un papel importante no sólo en las reacciones transfusionales, sino en la susceptibilidad a infecciones por parásitos como el *Plasmodium falciparum*, virus y bacterias. Además, algunas enfermedades, como la artritis reumatoide y la enfermedad de von Willebrand, se han asociado con alteraciones en la expresión de antígenos en la membrana de los eritrocitos (*Janatpour y col., 2008*).

Durante las tres últimas décadas se ha mejorado la seguridad en las transfusiones sanguíneas debido a una disminución en los riesgos de contaminación infecciosa; sin embargo, la transfusión con sangre incompatible continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. Una transfusión con sangre ABO incompatible tiene grandes riesgos y aun pequeñas cantidades pueden ser fatales en ciertas condiciones. La destrucción de los eritrocitos ocurre a nivel intravascular y es inmediata, produciendo coagulación intravascular diseminada, falla renal y muerte. Las causas más comunes no se asocian con errores técnicos, sino con errores administrativos, como fallas en la identificación de los pacientes o de las unidades a transfundir (*Janatpour y col., 2008*).

La transfusión sanguínea se debe monitorizar de cerca, en especial durante los primeros 30 minutos. Si se observa o percibe algún signo o síntoma asociado con una transfusión incompatible, como puede ser hipotensión, fiebre o sospecha de sangrado, se debe suspender la transfusión inmediatamente y dar el tratamiento apropiado (*Janatpour y col., 2008*).

2.6.5. Ámbito regulatorio para reactivos hemoclasificadores.

Los sueros hemoclasificadores son productos utilizados en la determinación de los antígenos de los grupos sanguíneos eritrocitarios (*CECMED, 2011*).

Para desarrollar un buen reactivo hemoclasificador, este debe ser específico para el antígeno que se desea detectar, suficientemente potente para dar una buena reacción macroscópica con variantes débiles de los grupos sanguíneos, además de mantenerse estable bajo las condiciones de uso cotidiano y un costo de producción razonable (*Wittig y col., 2006*).

Internacionalmente se reconoce que los sueros hemoclasificadores y los antiglobulínicos son diagnosticadores que tienen asociado un alto riesgo para el paciente, en caso de producirse una falla en su funcionamiento, pues esto podría provocar un daño importante e incluso la muerte del paciente. En Cuba, estos productos están clasificados en el Categoría III (máximo riesgo), según la Regulación "Clasificación de los Diagnosticadores por Categoría de Riesgo" vigente. Por ello, la Autorización de Comercialización (AC) de estos productos requiere evidenciar que los mismos

cumplen determinados requisitos específicos, además de los requisitos generales vigentes para este fin, comunes a la mayoría de los diagnosticadores.

La Regulación 59-2011 está basada en documentos vigentes de autoridades reguladoras de la Unión Europea y Estados Unidos, así como en recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, convenientemente adaptadas. El Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) establece en la Regulación No.59-2011 “Requisitos de los Diagnosticadores Utilizados en Inmunohematología”. Esta propia institución en el año 2011 elevó los estándares regulatorios para la comercialización de estos reactivos (CECMED, 2011).

El CECMED establece en la Regulación No.59-2011 los requisitos que deben cumplir los hemoclasificadores del sistema ABO dentro de estos se encuentra el hemoclasificador anti-B, dentro de los requisitos de calidad se encuentran: potencia, avidez y especificidad.

- **Potencia:** Es el recíproco de la mayor dilución del reactivo donde se observa una reacción de aglutinación. La potencia debe ser ≥ 512 .
- **Avidez:** Es el tiempo que media entre la mezcla del reactivo con los eritrocitos y la aparición de la aglutinación. En la avidez se observarán aglutinados en un intervalo ≤ 30 s.
- **Especificidad:** La capacidad del producto para identificar correctamente las muestras carentes del antígeno en cuestión. Se establece $\geq 2+$.

El sistema de calidad de LABEX tiene establecidas especificaciones para cumplir con los requisitos de la Regulación No.59-2011. Para ello existen controles durante todo el proceso, para chequear el cumplimiento durante el desarrollo de todas las etapas productivas hasta la obtención del producto final. La Organización Mundial de la Salud ha establecido estándares o patrones para regular el uso de los reactivos para la tipificación de los grupos sanguíneos que son internacionalmente comercializados. En un estudio publicado en el 2006, se propuso establecer como potencia de aglutinación mínima 256 para los hemoclasificadores anti-A y anti-B, a partir de los resultados de un ensayo ejecutado por 14 centros evaluadores de referencia mundial, con diferentes reactivos comerciales (*Expert Committee on Biological Standardization, 2006*). No obstante, para cumplir la regulación existente en el país, el Hemoclasificador anti-B que se produce en LABEX debe ser liberado a partir del cumplimiento de los requisitos de calidad establecidos por el CECMED en la Regulación No.59-2011 que se ensaya con muestras de sangre B y AB (LABEX, 2009).

La tecnología *in vivo*, permite obtener el producto Hemoclasificador anti-B más concentrado, pero brinda pequeños volúmenes de producto, con la tecnología *in vitro* se obtienen mayores niveles de producción. Para ello se debe seleccionar un medio de cultivo que proporcione al hibridoma seleccionado o disponible, los nutrientes y características fisicoquímicas adecuadas para un buen crecimiento y productividad, monitoreando los indicadores de calidad aprobados por la regulación existente en el país o internacionalmente.

La política de Calidad de LABEX es:

Diseñar, desarrollar y producir nuevos diagnosticadores destinados a ser utilizados in vitro en el estudio de muestras procedentes del cuerpo humano incluidas las donaciones de sangre y tejidos con garantía de trazabilidad e introducirlos en el SNS garantizando: el cumplimiento estricto de los requisitos y regulaciones para este tipo de productos, así como la prevención

de errores en el trabajo. Para ello trabajamos en aplicar un SGC según los requisitos de la NC ISO 9001 vigente con el compromiso de elevar continuamente la calidad de nuestros productos a los costos más bajos posibles para su comercialización en el mercado nacional e internacional, satisfaciendo las necesidades de nuestros clientes y con una adecuada gestión medio ambiental. Contamos para ello con el personal calificado, logrando un mayor desarrollo científico-técnico que evidencia la mejora continua de la eficacia del SGC.

2.7. Análisis de económico.

El análisis económico de un proyecto o trabajo se puede efectuar de diversas formas y está en dependencia de numerosos factores a considerar, que no se puede plantear una metodología específica a seguir en todos los casos. Sin embargo, se puede plantear una estrategia general que facilite llegar a resultados precisos con el menor esfuerzo y gasto de recursos aprovechables.

El objetivo fundamental de dicho análisis radica en mostrar el comportamiento de la proyección realizada, en detectar las desviaciones y sus causas, así como descubrir las reservas internas para que sean utilizadas para el posterior mejoramiento de la gestión de la organización (Figueredo, 2002).

Este análisis se puede hacer a partir de la determinación del costo producción de un proceso u obtención de un producto en cuestión.

Los costos de producción (también llamados costos de operación) son los gastos necesarios para mantener un proyecto, línea de procesamiento o un equipo en funcionamiento. En una compañía estándar, la diferencia entre el ingreso (por ventas y otras entradas) y el costo de producción indica el beneficio bruto (Núñez, 2011).

Esto significa que el destino económico de una empresa está asociado con: el ingreso (por ej., los bienes vendidos en el mercado y el precio obtenido) y el costo de producción de los bienes vendidos. Mientras que el ingreso, particularmente el ingreso por ventas, está asociado al sector de comercialización de la empresa, el costo de producción está estrechamente relacionado con el sector tecnológico; en consecuencia, es esencial que el tecnólogo conozca de costos de producción.

El costo de producción tiene dos características opuestas, que algunas veces no están bien entendidas en los países en vías de desarrollo. La primera es que para producir bienes uno debe gastar; esto significa generar un costo. La segunda característica es que los costos deberían ser mantenidos tan bajos como sea posible y eliminados los innecesarios. Esto no significa el corte o la eliminación de los costos indiscriminadamente.

El costo de producción de un producto es determinado o calculado a través de la utilización de la ficha de costo, en esta quedan recogidos los elementos que intervienen en el proceso de manufactura, así como los costos de los mismos, arrojando como resultado el costo total unitario de cada producto, para sobre esta base establecer los precios de venta.

➤ **Fichas de costo:** Es el modelo que se utiliza para recoger los datos necesarios para calcular el costo planificado unitario de un producto o la prestación de un servicio, basándose en

la tecnología aplicada en un período determinado, con la utilización racional de los recursos materiales y humanos, en función de esa producción o servicio a realizar.

Es necesario, por lo tanto, que en su cálculo participen todos los que de una forma u otra puedan aportar elementos técnicos o económicos que hagan posible la mayor exactitud de este costo.

La ficha de costo constituye un elemento o factor básico para la organización del cálculo económico, por tanto a través de ella se determina el nivel de eficiencia en la utilización de los recursos, al posibilitar comparar los gasto reales con los planificados o con los gastos normados, a su vez, es un elemento que permite la medición de la dinámica de los costos, al comparar los costos de una unidad determinada de productos en un período determinado con los obtenidos en períodos anteriores, así como la comparación de los costos entre empresas con producciones similares (Núñez, 2011).

Materialles y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1. Línea celular de hibridoma.

La línea celular utilizada es el Hibridoma anti-B, (clon BMS-4), secretor de una inmunoglobulina murina del tipo IgM (AcM anti-B), la cual reconoce específicamente al antígeno B sanguíneo en la superficie celular de los eritrocitos humanos. Las células se encuentran en el banco celular del LABEX, conservadas en crioviales en el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 8% a -196°C en atmósfera de nitrógeno (**LABEX, 2019**).

3.2. Medios de cultivo y suplementos.

3.2.1. Medios de cultivo utilizados.

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

El hibridoma fue cultivado en medio RPMI-1640 (SIGMA™) suplementado con Suero Fetal Bovino al 8 %. La formulación basal RPMI 1640 fue desarrollada por Moore y sus colaboradores del Roswell Park Memorial Institute para mantener células humanas en cultivo (www.laboratoriomicrovet.com). El medio se preparó del siguiente modo: RPMI 1640 en polvo (10.4 g/L), Bicarbonato de Sodio (2.00 g/L), Piruvato de Sodio (0.11 g/L), L-Glutamina (0.30 g/L), solución de 2-Mercaptoetanol al 0.5 % (1 ml/L), HEPES (4.30 g/L) y Suero Fetal Bovino (80 ml/L).

PFHM-II (Gibco®, USA):

Formulación libre de proteínas perteneciente a la línea de productos Gibco® de Invitrogen life technologies™ fue diseñada y optimizada para el crecimiento libre de suero de hibridomas y la producción de anticuerpos monoclonales (www.fishersci.com). Esta formulación fue considerada para el desarrollo de un futuro proceso por haber sido usado con éxito en el CIM y por los datos de desempeño reportados por el fabricante. El medio fue preparado como sigue: PFHM II en polvo (15,01 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), Glucosa (1,00 g/L), Pluronic F-68/ Kolliphor P-188 (1,00 g/L) y se ajusta el pH con HCl.

MyeloCIM

MyeloCIM (CIM, Cuba): Formulación libre de proteínas químicamente definida, formulada a partir de la combinación de los medios basales RPMI 1640, IMDM y DMEM/F-12. La formulación fue desarrollada por el Departamento de Investigación y Desarrollo del CIM como alternativa de uso de PFHM-II. El medio fue preparado como sigue: MyeloCIM en polvo (12,18 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), Citrato férrico (0,023 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), solución de 2-Mercaptoetanol al 0.5 % (1 ml/L), Hepes (2,546 g/L), D(+)Glucosa (1,62 g/L), solución Stock de Insulina 5mg/mL (1 mL/L), Pluronic F-68/ Kolliphor P-188 (1,00 g/L) y se ajusta el pH con HCl.

DMEM/F12

DMEM/F12 Medium es un 1:1 mixto de Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) y Ham's F-12 Medium, comúnmente usado en una creciente variedad de cultivos de células de mamíferos. DMEM/F12 es rico y complejo, contiene los 21 aminoácidos, 10 vitaminas, glucosa, zinc, y hierro

entre otros componentes. Este es un medio sintético libre de proteína y suero y por lo tanto puede requerir ser suplementado dependiendo del tipo de cultivo. Algunas formulaciones comerciales pueden no contener glutamina o rojo fenol. El medio es preparado de la siguiente forma: DMEM en polvo (12 g/L), solución de 2-Mercaptoetanol al 0.5 % (1 mL/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), HEPES (4,30 g/L), Piruvato de Sodio (0.11 g/L), Agua Purificada 1L.

3.2.2. Suplementos utilizados en los medios de cultivo.

*** Suero fetal bovino**

El suero fetal bovino provisto por *Hyclone* suele utilizarse para propiciar el crecimiento de células en cultivo. El suero fetal es una fuente rica en factores de crecimiento y es apropiado para el clonado celular y el crecimiento de células delicadas. Se presenta en forma de líquido.

*** Insulina**

Se utiliza una solución stock de insulina en polvo cuyo proveedor es *Novo Nordisk* a una concentración de 5 g/L diluida en HCl a 0.4 M añadiendo al medio de cultivo 1 mL/L.

*** Cell Boost 5 (Hyclone)**

HyClone™ Boost Cell 5 Suplemento en forma de polvo está diseñado para proporcionar nutrientes tales como lípidos, aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento. Se utiliza a una concentración de 3 g/L en el medio de cultivo (<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=17792>).

3.3. Diseño de mezclas de medios de cultivo a utilizar y empleo de suplementos.

El diseño de mezclas de los medios de cultivo se realizará en base a los resultados de la cinética. Teniendo en cuenta esos resultados se escogerán los medios de cultivo cuyo sobrenadante obtenido marque potencia > 512 y sobrenadante con potencia < 512 con el objetivo de mejorar esta potencia de aglutinación.

Los suplementos a utilizar serán SFB y CB5, se escogen estos suplementos teniendo en cuenta las ventajas que pueden ofrecer a los cultivos según la revisión bibliográfica realizada (*Da Silva, 2017*).

También se realizarán mezclas entre medios de cultivo basales, pero sin alterar la concentración de estos en la formulación y mezclas entre medios de cultivos basales añadiéndole un suplemento (**Tabla 4**).

➤ Formulación de la combinación D+P

D+P: PFHM II en polvo (6 g/L), DMEM/F12 en polvo (6 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), Glucosa (1,00 g/L), Pluronic Kolliphor P-188 (1,00 g/L), Agua Purificada (1L), HEPES (4,30 g/L), Piruvato de Sodio (0.11 g/L), 2-Mercaptoetanol (1mL/L) y se ajusta el pH a 6,9-7,2 con HCl.

- Formulación de la combinación D+P+C

D+P+C: PFHM II en polvo (6 g/L), DMEM/F12 en polvo (6 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), Glucosa (1,00 g/L), Pluronic Kolliphor P-188 (1,00 g/L), Agua Purificada (1L), HEPES (4,30 g/L), Piruvato de Sodio (0.11 g/L), 2-Mercaptoetanol (1mL/L), Cell Boost 5 (3 g/L) y se ajusta el pH a 6,9-7,2 con HCl.

- Formulación de la combinación P+C

P+C: PFHM II en polvo (6 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), Glucosa (1,00 g/L), Pluronic Kolliphor P-188 (1,00 g/L), Agua Purificada (1L), Cell Boost 5 (3 g/L) y se ajusta el pH a 6,9-7,2 con HCl.

- Formulación de la combinación P+S

P+S: PFHM II en polvo (15.01 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), Glucosa (1,00 g/L), Suero fetal bovino (80 mL), Agua Purificada (1L) y se ajusta el pH a 6,9-7,2 con HCl.

- Formulación de la combinación D+C

D+C: DMEM en polvo (12 g/L), 2-Mercaptoetanol (1mL/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), Pluronic Kolliphor P-188 (1,00 g/L), HEPES (4,30 g/L), Piruvato de Sodio (0.11 g/L), 2-Mercaptoetanol (1mL/L), Agua Purificada (1L) y Cell Boost 5 (3 g/L).

Tabla 4. *Combinaciones de medio de cultivo utilizados para el cultivo del hibridoma anti-B.*

COMBINACIONES	DENOMINACIÓN	COMPOSICIÓN
DMEM/F12+ PFHM-II	D+P	6g + 6g
DMEM/F12+PFHM-II+ CB5	D+P+C	6g + 6g + 3g
PFHM-II +CB5	P+C	12g + 3g
DMEM/F12+ CB5	D+C	12g + 3g
PFHM+SFB	P+S	15.01g + 8%

3.4. Cultivo celular

3.4.1. Cultivo celular a escala de laboratorio.

Para iniciar los cultivos celulares a escala de laboratorio, se realizó la descongelación de un criovial del banco celular de anti-B. Luego se realizó la expansión celular, donde se utilizaron frascos de cultivo estándar de 25, 75, 175 cm² Greiner Bio-One™ (**Anexo 1.**) secuencialmente, hasta alcanzar la cantidad de células necesarias para iniciar los estudios cinéticos a escala de laboratorio en frascos rotatorios de 850 cm² Greiner Bio-One™.

El cultivo celular se mantendrá a una temperatura de 37 °C, a una velocidad de agitación de 3 rpm en caso que el cultivo celular este en frascos rotarios de 850 cm² (**Anexo 1.**), partiendo de una concentración celular inicial de 0.3×10^6 cel/mL y una viabilidad de mínima de 80 %.

Se determinará la concentración de células vivas, muertas y totales, la viabilidad del cultivo, el tiempo de duplicación y velocidad específica de crecimiento a partir de la toma de muestras cada 24 horas y el conteo celular en cámara de Neubauer empleando el método de exclusión con el colorante vital Tripán azul al 0,4%.

3.4.2. Adaptación del hibridoma a otros medios de cultivo.

El Hibridoma Anti-B fue adaptado a los medios de cultivo PFHM II y MyeloCIM empleando el método de adaptación secuencial y por el método directo al medio DMEM/F-12 suplementado con suero fetal bovino al 8 %. El medio RPMI 1640 suplementado con 8% de suero fetal bovino se fue sustituyendo paulatinamente por los otros medios disminuyendo en un 25 % cada vez que el cultivo alcanzó alta confluencia y las células mostraron una buena morfología típica al ser observadas al microscopio. Para la adaptación directa se sustituyó totalmente el RPMI 1640 suplementado con 8% de suero fetal bovino por el DMEM/F-12 suplementado con 8 % de suero fetal bovino y se fue trabajando el cultivo a medida que la confluencia fue aumentando.

Cuando las células alcanzaron alta confluencia en los medios de cultivo se expandió el cultivo a frascos de cultivo de 175 cm² hasta llegar a los frascos rotatorios de 850 cm² para completar la adaptación y comenzar la caracterización cinética. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios de adaptación de las células a los medios de cultivo:

- Concentración celular de cultivo $> 0.7 \times 10^6$ cel/mL.
- Viabilidad celular del cultivo ≥ 80 %.
- Actividad biológica: Potencia: ≥ 512 y Aidez: ≤ 30 s. (verificada al final de la adaptación, cuando el hibridoma está en cultivo en el 100% de los medios de cultivo DMEM/ F-12, PFHM-II o MyeloCIM).

3.4.3. Caracterización cinética del hibridoma anti-B

La caracterización cinética del hibridoma anti-B se realizó en los medios de cultivo que mejor desempeño tuvieron en el proceso de adaptación celular.

Para la caracterización cinética se realizó por duplicado en cada medio de cultivo propuesto, utilizando frascos rotatorios de 850 cm² Greiner Bio-One™ en un volumen de trabajo de 500 mL, para una concentración celular de 0,3 x 10⁶ células/mL, viabilidad celular superior al 80 %, a una temperatura de 37 °C y a una velocidad de agitación de 3 rpm en una Base de agitación CELLROLL CellSpin® (Integra Biosciences AG) (**Anexo 1.**).

A partir de la hora de siembra y cada 24 horas se tomaron muestras de alrededor 1-1,5 mL de cada frasco. A cada muestra se les determinaron la concentración de células vivas, la concentración de células muertas, la concentración de células totales y la viabilidad celular a partir del método de conteo celular en cámara Neubauer. Posteriormente cada muestra fue centrifugada a 1000 r.p.m durante 5 minutos, y el sobrenadante libre de células fue almacenado a 2-8 °C hasta su posterior análisis.

3.4.3.1. Determinación de variables y parámetros cinéticos.

El valor de la concentración de las células vivas, muertas, totales se determinarán utilizando la **Ecuación 2**:

$$X_{v,m,t} = \frac{S_{v,m,t}}{n} \times Fd \times Fc (Ec. 2)$$

Donde:

- **X v, m, t**: concentración celular de las células vivas, muertas o totales según el caso a determinar (cel/ml).
- **S v, m, t**: suma de la cantidad de las células vivas, muertas o totales según el caso a determinar (cel/ml).
- **n**: número de cuadrantes de la Cámara de Neubauer (4 cuadrantes).
- **F_d**: factor de dilución de la muestra en Tripán azul al 0,4 %. Es el inverso de la dilución, por tanto, es 2.
- **F_c**: factor constante de la cámara, derivado del volumen que encierra un cuadrante de la cámara: 10⁴.

La viabilidad del cultivo (V_b), representada por el porcentaje de las células vivas (S_v) con respecto a las células totales (S_t), en una suspensión celular se determinó por la **Ecuación 3**:

$$Vb (\%) = \frac{Sv}{St} \times 100 (Ec. 3)$$

La Velocidad específica de crecimiento máxima se determinó mediante la **Ecuación 4**:

$$\mu_{max} = \frac{\ln X_{vf} - \ln X_{vi}}{t_f - t_i} \dots (Ec. 4)$$

Donde:

- **μ_{max}** : velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1}).
- **X_{vf}** : concentración celular (de células vivas o totales según el caso) en el último punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial (cel/ml).
- **X_{vi}** : concentración celular (de células vivas o totales según el caso) en el primer punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial (cel/ml).
- **t_f** : tiempo transcurrido en el último punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial (h).
- **t_i** : tiempo transcurrido en el primer punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial (h).

Por su parte el **Tiempo de duplicación** fue determinado haciendo uso de la **Ecuación 5**:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \dots (Ec. 5)$$

Donde:

- **td** : tiempo de duplicación de las células en cultivo en fase de crecimiento exponencial (h).

Para determinar el **Numero de generaciones**, se utilizó la siguiente expresión matemática:

$$Ng = \frac{t_t}{t_d} \dots (Ec. 6)$$

Donde:

- **Ng** : número de generaciones.
- **t_t** : tiempo de duración del cultivo.
- **td** : tiempo de duplicación.

3.5. Técnicas analíticas utilizadas en el estudio.

3.5.1. Separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de la molécula de IgM.

Con el objetivo de identificar la molécula (anticuerpo anti-B) IgM del resto de los componentes de la muestra dializada en PBS, se llevó a cabo corridas cromatográficas utilizando un equipo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en Ingles), LC-2010CHT, Liquid

Chromatograph Shimadzu. Se utilizó una columna TSKgel® G3000SW_{XL} (Tosoh Bioscience™) de exclusión molecular, obteniendo los cromatogramas a través del Registrador LKB 2210 (Recorder™) (Tosoh, 2019). Los picos colectados de todas las muestras de sobrenadante anti-B ensayadas, fueron caracterizadas por aglutinación en láminas. De los sobrenadantes purificados se colectarán los picos a los cuales se les asocia la actividad IgM para cuantificar por espectrofotometría.

3.5.2. Medición de la actividad biológica de los sobrenadantes.

Para determinar la actividad biológica del sobrenadante anti-B, se determinará la potencia, avidez e intensidad mediante las técnicas de hemaglutinación. Donde el procedimiento plantea los siguientes pasos para la realización de las mismas.

✓ Potencia de aglutinación

1. Tomar 3 muestras de hematíes de fenotipo B y AB.
2. Lavar tres veces con solución salina fisiológica (SSF) a 1500 rpm por 10 min y preparar una suspensión al 2 % de hematíes en SSF con albúmina al 2 %.
3. Realizar diluciones dobles progresivas del sobrenadante anti-B a analizar en SSF con albúmina al 2 %.
4. Mezclar 100 µl de la suspensión al 2 % de hematíes en SSF con albúmina al 2 % con 100 µl de las diluciones de las muestras a analizar.
5. Incubar 5 min a 37 °C.
6. Centrifugar 1 min a 1000 rpm.

✓ Avidez

En láminas portaobjetos se mezclaron 50 µl de sobrenadante de cultivo anti-B, con 50 µL de una suspensión al 40 % de hematíes de fenotipo B y AB en Solución Salina Fisiológica. La avidez se determinó midiendo el tiempo transcurrido desde el mezclado hasta la aparición de la aglutinación.

✓ Intensidad

La intensidad se determinó por la lectura directa según el grado de reacción de la aglutinación establecida. Realizar la lectura de los aglutinados por inspección visual en la escala de 1+ a 4+. Los valores numéricos que se le asignan a la intensidad de aglutinación y la forma en que se expresan se encuentran en la siguiente **Tabla 5**.

Tabla 5. *Escala para realizar la lectura de intensidad de los aglutinados por inspección visual.*

CRUCES	FORMAS DE AGLUTINACIÓN.
4+	Aglutinación total de los eritrocitos en un solo cúmulo grande en un fondo claro.
3+	2 o 3 aglutinados grandes en un fondo claro.
2+	Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo.
1+	Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo.
±	Pequeños aglutinados no definidos, que pueden resultar dudosos. (Esta reacción es negativa). No aglutinación
0	No aglutinación.

3.6. Procesamiento y Análisis de los resultados.

El procesamiento y análisis de los resultados experimentales obtenidos se efectuará empleando el programa informático Microsoft Office Excel 2013 instalado en el Sistema Operativo Windows 8.1 Profesional o el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion versión 15.1.0. Se empleará un Anova simple (factor: medio de cultivo con tres niveles: variantes de formulación de medio), se utilizarán los estadígrafos media aritmética y desviación estándar. Se empleará la prueba de múltiples rangos para comparar estadísticamente los *resultados con un nivel de confiabilidad de un 95.0 %*.

3.7. Análisis económico

A partir del objetivo de disminuir los gastos o los costos en el proceso productivo del Hemoclasificador anti-B en base a las nuevas propuestas productivas, se estimará el costo de producción y la ganancia.

Para determinar el costo de producción se elaboraron fichas de costo para cada una de las propuestas productivas, cada ficha de costo se construyó con ayuda de las fichas técnicas de cada etapa o subetapa del proceso productivo en las cuales se estableció: salida de la etapa (producto intermedio), materias primas y materiales gastados en el proceso y la cantidad empleada según unidad de medida, recursos humanos con salarios y horas empleadas en cada etapa.

A partir de las fichas técnicas se conformaron las fichas de costos en las que se aplicaron precios e importes a los recursos empleados en cada etapa del proceso, así como costos indirectos.

Resultados y Discusión

4. Resultados y Discusión

4.1. Análisis de la información obtenida sobre los medios de cultivo y su utilidad en el crecimiento de hibridoma anti-B.

El paso más importante y crucial en el cultivo celular *in vitro* es la selección de un medio de cultivo apropiado. El medio de cultivo es un líquido o un gel diseñado para favorecer el crecimiento de microorganismos, células o pequeñas plantas. La elección del medio depende del tipo de células a ser cultivadas, del propósito del cultivo y de los recursos disponibles en el laboratorio. Varias líneas celulares requieren condiciones de crecimiento muy específicas, por tanto, el medio más adecuado para cada tipo de línea celular debe ser determinado experimentalmente (Arathoon y Birch, 1985).

Los sistemas biológicos que más se usan a nivel industrial, para la producción de AcMs, son las líneas celulares NS0 (células de mieloma murino Null Secretor) y células CHO (células ováricas de hámster chino). Las NS0 son auxótrofas para el colesterol y no expresan glutaminas sintetasas, utilizándose esto para su selección. Las células CHO son muy usadas en la industria biotecnológica por su versatilidad y alta producción, pero provoca problemas de tolerancia a pacientes debido a las glicoformas de los anticuerpos producidos, que pueden generar auto-anticuerpos; por lo que se es muy reticente su uso en la obtención de anticuerpos para fines terapéuticos (Li y col., 2010).

Teniendo en cuenta que la línea celular que se utilizó es un Hibridoma anti-B, clon BMS-4, en específico un hibridoma murino, productor de un anticuerpo tipo IgM, se estudiaron los medios de cultivo y suplementos recomendados para esta línea celular. Por otro lado, como consenso se tiene que puede utilizarse variedad de modos de cultivo para estos tipos de Hibridomas, siendo el de uso preferencial: el cultivo estático o agitado, con células en suspensión, lote o lote incrementado, proyectándose de esta forma los siguientes resultados del análisis crítico del estado del arte.

Comenzando su análisis por la línea celular de interés, clon BMS-4, su referente parte de las líneas celulares NS0, mieloma murino y es obtenido por manipulación genética mediante fusión celular de estas con linfocitos, obteniendo un hibridoma murino. Esta fusión celular adiciona complejidad metabólica; por lo que, en estudios de cultivos celulares primarios se prefiere el uso de medios complejos, que provea de variedad de nutrientes para no limitar su crecimiento, por ej. para el desarrollo de los bancos celulares.

La diversidad de líneas celulares y el hecho de que haya tantos componentes en los medios, hace muy complicada su selección, por lo que es de preferencia el uso de un medio definido en el que se conocen todos y cada uno de los componentes, así como la concentración exacta en que se encuentran. Sin embargo, para muchas líneas no se han llegado a establecer medios definidos, pues se requiere conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. El hecho de que muchos de estos componentes son interdependientes entre ellos, dada la complejidad de las vías del metabolismo celular, les añade otro reto a las investigaciones en el

tema. En general, en los protocolos de selección de medios de cultivo para células, siempre se aconseja empezar con MEM para células adherentes y RPMI-1640 para células en suspensión.

La mayoría de las empresas proveedoras de insumos para cultivos celulares, comercializan los medios completos listos para usar, condicionados ya con todos los suplementos; en estos destacan *SIGMA*, *ATCC* e *Invitrogen Life Technology*. Esto reduce el riesgo de contaminación y además ahorra tiempo, dinero y trabajo, al eliminar los pasos de preparación y suplementación necesarios. Además, todos estos medios se someten a exhaustivos controles de calidad y cada lote es rutinariamente evaluado por su capacidad de promover el crecimiento, ausencia de toxicidad y parámetros físicos fijos como la osmolalidad y el pH, descritos como de gran incidencia en el crecimiento (*Butler, 2005*).

Los medios de cultivo más comunes incluyen los anteriormente mencionados y se explican en detalle en los sitios de *Sigma-Aldrich*, *Thermo Fisher Scientific- Invitrogen™*, *American Type Culture Collection* (www.sigmaaldrich.com; www.thermofisher.com; <https://www.atcc.org/>)

A continuación, se exponen características de los que son de elección para este trabajo:

El medio esencial mínimo de Eagle, MEM, fue uno de los primeros medios de amplio uso y fue formulado por Harry Eagle a partir de un medio basal más simple.

Medio esencial mínimo de Eagle (del inglés, MEM)

El MEM contiene una solución salina equilibrada, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio; por lo que es un medio sin proteínas. Está formulado con una concentración de bicarbonato de sodio reducida (1500 mg/l) para usar con 5% de CO₂. Dado que el MEM es un medio basal, generalmente se fortifica con suplementos adicionales o niveles de suero mayores, haciéndolo apropiado para una amplia gama de células de mamíferos.

Por su parte, el RPMI-1640 es un medio de uso general con un amplio rango de aplicaciones en células de mamíferos, en especial células hematopoyéticas.

RPMI-1640

El RPMI-1640 fue desarrollado en el *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) en Buffalo, Nueva York, en 1967. El RPMI-1640 es una modificación del 5A de McCoy y fue diseñado para el cultivo a largo plazo de linfocitos de sangre periférica. Contiene 19 aminoácidos esenciales y no esenciales que incluyen glicina, además de 11 vitaminas. El RPMI-1640 usa un sistema de tampón de bicarbonato y difiere de la mayoría de los medios de cultivo de células de mamíferos en que su pH típico es de 8. El RPMI-1640, es un medio complejo que permite el crecimiento de una amplia variedad de células en suspensión y crecidas en monocapa. Es un medio que no contiene proteínas, pero si se le suplementa adecuadamente con suero o un remplazo adecuado del suero, el RPMI-1640 tiene un amplio rango de aplicaciones para células de mamíferos; incluyendo el cultivo de linfocitos humanos recién extraídos, protocolos de fusión y el crecimiento de células híbridas.

De un estudio bibliográfico de 750 referencias con citas de medios de cultivos celular, realizado por Labome hasta el 2013, tanto el MEM como el RPMI habían sido utilizados en 117 artículos (15.6 %); cuyos proveedores principales eran *Invitrogen™* y *SIGMA™*, respectivamente (*Arora,*

2013). Destaca en esta revisión la utilización del medio DMEM en el 30 % de los artículos revisados (223/750), siendo comercializado por estas dos empresas anteriormente referidas (<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>).

Tanto el medio MEM como el DMEM, son medios basales libres de proteínas, al igual que el RPMI-1640; los que pueden ser suplementados con sueros proteicos y otros componentes para mejorar su desempeño.

El DMEM fue utilizado en un principio para el cultivo de células madre de embrión de ratón y ha demostrado ser ampliamente aplicable en estudios de células primarias de ratón y de pollo, de formación de placa viral y de inhibición por contacto.

Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, DMEM)

El DMEM tiene casi el doble de concentración de aminoácidos y cuatro veces la cantidad de vitaminas que el MEM, así como nitrato férrico, piruvato de sodio y algunos aminoácidos suplementarios. La formulación original contenía 1 g/L de glucosa, usado para cultivar células embrionarias de ratón, pero una variante posterior con 4,5 mg/L de glucosa ha mostrado ser óptima para el cultivo de una gran variedad de células. El DMEM utiliza un sistema de tampón de bicarbonato de sodio (3.7 g/L), el cual es agregado al medio momento de disolver el polvo en agua, y por lo tanto requiere de niveles artificiales de CO₂ para mantener el pH requerido. El DMEM es un medio basal y no contiene proteínas o agentes que promuevan el crecimiento, por lo que comúnmente se suplementa con 5 a 10 % de suero fetal bovino.

No obstante, hacerse referencia a los usos originarios de estos medios de cultivo, en la **Tabla 6** se definen las diferentes líneas celulares que han sido “cultivadas” empleando estos.

Es necesario referir que *Sigma-Aldrich* es una compañía americana perteneciente a *Merck KGaA*, el mayor proveedor de reactivos bioquímicos, químicos, orgánicos y kits para la investigación y la industria biotecnológica. Es una Corporación que cuenta con subsidiarias en 37 países y radica sus oficinas centrales en Missouri, Estados Unidos. Por su lado, *Thermo Fisher Scientific-Life Technology*, es una corporación proveedora de productos biotecnológicos, máquinas y consumibles, que tiene varias marcas bajo su “sombra” como *Invitrogen™* y tiene su sede en Massachusetts, E.U.A. Por lo que, existe un gran riesgo en el uso de estos medios como base de procesos fermentativos biotecnológicos en Cuba, pues podrían estar afectadas sus provisiones por las barreras que establece el “bloqueo americano” al flujo normal de importaciones de insumos de estas empresas altamente reconocidas por la calidad de sus productos. Por lo que resulta apropiado establecer variantes de medios de cultivos, que puedan ser accesibles para el CIM, convirtiéndose en una estrategia empresarial referente a la sustitución de importaciones.

En la Plataforma de Medios de Cultivo para Hibridoma en desarrollo, usados en el CIM con base a los de Merck, se destacan medios propios basales, diseñados y evaluado para líneas celulares CHO y NS0: MB02F0C0-CPCHO; MB03F0C0-MyeloCIM; MB04F0C0-CIMEDAZ3A; MB05F0C0-MB02F0C0+MB03F0C0; MB09F0C0-Myelocim++; (**Fig. 10**). En la Plataforma usada para cultivos de líneas NS0 se utiliza el MyeloCIM como medio basal y sus combinaciones; aunque también han existido algunos, aunque pocos, estudios del uso del CPCHO con suplementos para líneas derivadas de estas células (*Galván, 2013*).

Tabla 6. Diferentes células/líneas celulares que pueden ser cultivadas por los medios de cultivo (Arora, 2013).

MEDIOS	TEJIDO O LÍNEA CELULAR
RPMI-1640	Células T y timocitos, células madres hematopoyéticas, tumores humanos, células humanas de leucemia linfoblastoide, mieloma de ratón, leucemia de ratón, eritroleucemia de ratón, hibridoma de ratón, células de hígado de ratas.
MEM	Fibroblastos embrionarios, células CHO, células nerviosas embrionarias, células tipos alveolares, endotelio, epidermis, glioma, tumores humanos, melanomas.
DMEM	Endotelio, células epiteliales alveolares fetales, epitelio de cuello de útero, células gastrontestinales, neuroblastoma de ratón, células porcinas de la glándula tiroides, líneas celulares de carcinomas de ovario, células de músculos esqueléticos, células de Sertoli, fibroblastos de hámster. Células de mamíferos.

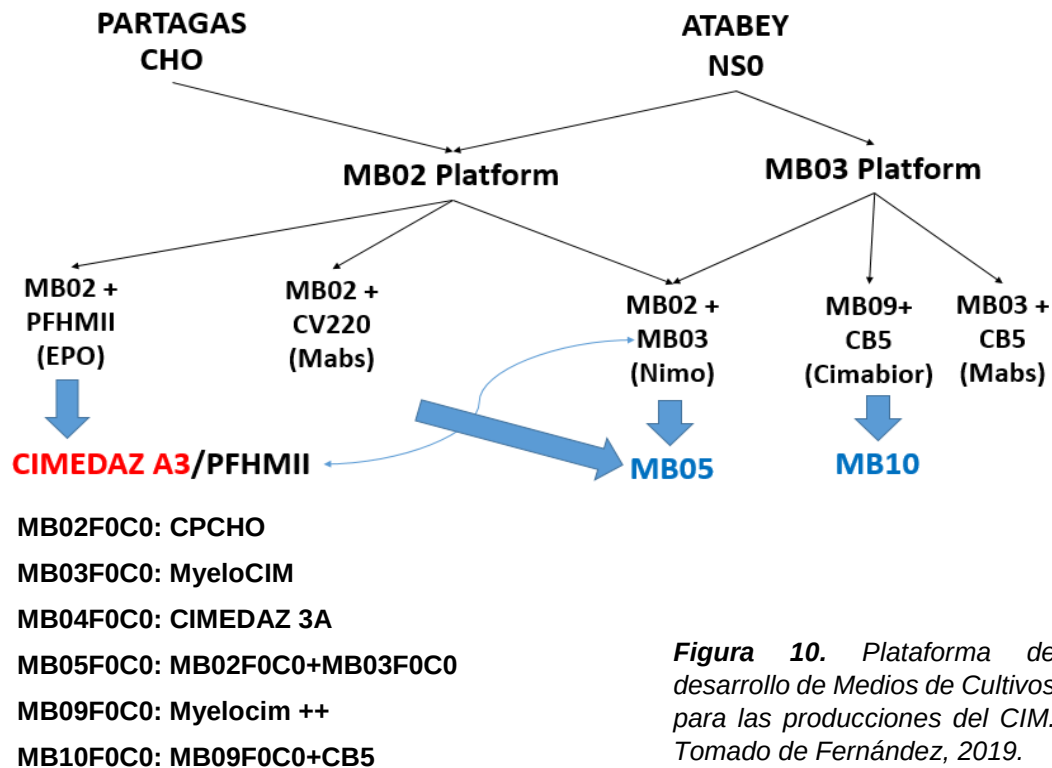


Figura 10. Plataforma de desarrollo de Medios de Cultivos para las producciones del CIM. Tomado de Fernández, 2019.

MyeloCIM

El medio de cultivo MyeloCIM es una combinación de los medios comerciales RPMI-1640, DMEM/F12 e IMDM, es producto de la búsqueda de alternativas que permitan sustituir importaciones, principalmente si las mismas son de origen estadounidense. Fue diseñado por el Departamento de Investigación y Desarrollo del CIM (INIM), el cual posee la propiedad intelectual del mismo y constituye el medio básico para el cultivo de células NS0, en la Plataforma de esta empresa. También se ha utilizado para el cultivo de células productoras de otros AcMs, en otras empresas de Biocubafarma (*Galván y col., 2016*).

MyeloCIM es un medio libre de suero, de proteínas, así como de elementos de origen animal. Es además un medio químicamente definido, por lo que se conocen las materias primas que lo componen desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo.

Este medio de cultivo ha sido utilizado por investigadores en desarrollo de algunas líneas celulares como líneas de hibridomas, CHO y NS0. Se reportan algunos trabajos como el realizado por Miranda en 2011, se realizó la adaptación y caracterización cinética del hibridoma t4 anti-CD4 donde la concentración máxima de células vivas resulta semejante a la obtenida en RPMI 1640 + 8%SFB.

Este medio de cultivo es utilizado en combinación con medio de cultivo CPCHO en una mezcla de medio de cultivo para la producción de AcM Racotumomab secretado por el hibridoma murino 1E10/2H6, así reporta el trabajo realizado por Rivera en 2016, en el cual la productividad volumétrica del hibridoma llega a 30,2 mg/L/h en CPCHO+MyeloCIM.

Por su lado, el DMEM/F12 es una mezcla de DMEM y el Ham's F-12 (1:1) y es un medio extremadamente rico y complejo. El tampón HEPES se incluye en la formulación a una concentración final de 15 mM, para compensar la pérdida de capacidad tamponadora debido a la eliminación del suero.

El DMEM/F-12 junto al PFHM-II son parte de mezcla de medio cultivo usado en la obtención del AcM Racotumomab. Actualmente este anticuerpo se utiliza en el tratamiento de cáncer avanzado de pulmón, patología que representa la mayor incidencia en cáncer en Cuba y en el mundo, mostrando resultados alentadores. Esta producción se basa en la fermentación de la línea celular de hibridoma murino 1E10/2H6 reportando valores de concentración de IgG alrededor de los 20 µg/mL con el empleo del medio P+D (*Castillo, 2015*) (**Anexo 2.**).

Las Mezclas de nutrientes de Ham

Fueron desarrollados originalmente para soportar el crecimiento clonal de células de ovario de hámster chino: CHO. Ha habido numerosas modificaciones de la formulación original, incluyendo el medio F-12 de Ham, una formulación más compleja que la original F-10 adecuada para la propagación celular libre de suero. Las mezclas fueron formuladas para ser utilizadas con o sin suplementación por suero, dependiendo del tipo de célula que se cultive (<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>).

Otros componentes del MyeloCIM provienen del IMDM.

Medio Dulbecco modificado por Iscove (del inglés, IMDM)

El IMDM es un medio complejo, sintético, altamente enriquecido, apto para los cultivos de células de proliferación rápida y de alta densidad. El IMDM es una modificación del DMEM que contiene selenio, aminoácidos adicionales, vitaminas y sales inorgánicas, comparada con el DMEM. Contiene nitrato de potasio en vez de nitrato férrico y además contiene hepes y piruvato de sodio.

Este medio fue formulado para el crecimiento de linfocitos e hibridomas. Diversos estudios han demostrado que el IMDM permite cultivar linfocitos B de ratón, tejido hematopoyético de médula ósea, células B estimuladas con lipopolisacárido, linfocitos T y una gran variedad de células de hibridoma (Hernández, 2015). La incorporación de HEPES le permite una mayor capacidad de tamponamiento en un rango estrecho pH de 7,2-7,4 y no requiere de una atmósfera gaseosa controlada; pero adiciona costos, pues es un componente relativamente caro, y tóxico para algunos tipos celulares.

Haciendo una revisión de los trabajos desarrollados en el LABEX para el cultivo de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales para obtención de IFA anti-B, se resumen las estrategias de medios de cultivos utilizados (**Fig. 11**).

En LABEX el proceso *in vitro* para la producción de AcM hemoclasificadores está establecido con el medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 8 % de suero fetal bovino SFB, debido a las altas productividades que se obtienen, siendo recomendado para cultivos en suspensión (Ávila, 2015). Con el mismo son producidos actualmente los anticuerpos anti-D y anti-D débil (Du), para reconocimiento del antígeno eritrocitario Rh, los que son cultivados en frascos rotatorios como sistema de fermentación, con muy buenos resultados; y además se conserva la línea celular del Hibridoma anti-B, en los bancos celulares (Casado, 2017).

También se ha usado ampliamente el medio PFHM-II, en cultivos de hibridomas productores de AcM para reactivos de diagnósticos en LABEX, constituyendo la otra plataforma de medios más probadas para estos fines (**Fig. 11**) (Casado, 2017; Téllez, 2017). Este medio, aunque no es muy usado en el CIM, para cultivo de líneas celulares derivadas de células NS0 según su Plataforma (**Fig. 10**), no constituye un error su uso como medio basal por cuanto es un producto libre de suero animal y de proteínas, optimizado para el crecimiento de hibridomas y la producción de anticuerpos monoclonales.

✚ PFHM-II (*Protein-free Hybridoma Medium*), comercializado por la firma Gibco®, de Invitrogen Life Technologies™. Usado para cultivo de hibridomas y mielomas, en la producción de AcMs, es un medio libre de suero animal y otras proteínas, conteniendo rojo fenol y transportadores de hierro.

Se reporta el uso de PFHM-II en el trabajo realizado por Casado en 2017 para obtener sobrenadantes anti-B, obteniéndose muy bajos resultados de productividad y actividad biológica (≤ 256), comparando con los resultados obtenidos en RPMI-1640, que fueron de 4096 y 2048 en potencia, para el fenotipo B y AB respectivamente. Se observó una discreta mejoría en la viabilidad celular, no existiendo diferencias significativas en los valores cinéticos del crecimiento (**Anexo 3**).

En el estudio cinético realizado por Jústiz en el 2013, del clon C6G4 (perteneciente a los bancos celulares de LABEX), productor de una molécula anti-B de tipo IgG, en cultivos de alta densidad celular a diferencias del trabajo anterior, se obtuvieron productividades dos veces superiores en

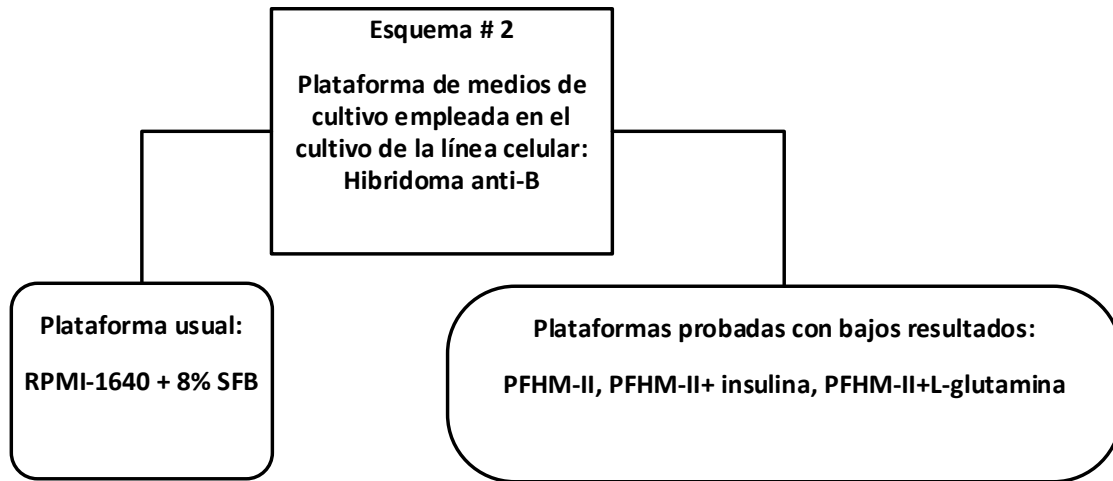


Figura 11. Plataforma de medios de cultivos usados en el LABEX para cultivo celular in vitro del Hibridoma anti-B.

medio PFHM con respecto al medio RPMI + 8% SFB, con igual mejora de los parámetros cinéticos después de la adaptación; pero, la potencia de aglutinación máxima fue de 16 con ambos fenotipos (**Anexo 4.**), sugiriendo una movilización de energías metabólicas para crecimiento celular, más que para la producción del AcM.

Por otra parte, Miranda en el 2011 reporta que el Hibridoma t4 anti-CD4 cultivado en PFHM valores de productividad superiores 8,7 veces y en MyeloCIM 3.5 veces, con respecto al medio de cultivo en que comúnmente se cultiva el RPMI1640 + 8% SFB (**Anexo 5.**).

En el trabajo realizado en el 2015 por Vitón y col., la caracterización del Hibridoma L3 anti-CD45 en medio PFHM, productor de IgG anti-CD, la adición de insulina aumentó considerablemente la producción del anticuerpo de interés, obteniéndose los mejores valores para 10 mg/L de insulina; donde el uso de la insulina favoreció el metabolismo de la glucosa, direccionando la energía disponible hacia la síntesis de proteínas (**Anexo 6.**).

Lee y col., en 1997 presentaron la hipótesis sobre el mecanismo de producción de anticuerpos en el hibridoma pudiendo ser considerado como un parásito en las células de mieloma, compitiendo con la célula hospedera por el sustrato limitante, los cuales pueden ser de naturaleza proteica o aminoácidos esenciales.

Por su lado, Leno y col., en 1992 llegaron a la conclusión de que los hibridomas de rápido crecimiento celular, deben dirigir la energía celular a la síntesis de componentes intracelulares necesarios para su supervivencia y como consecuencia, se reduce la secreción de anticuerpos monoclonales. Por lo que los hibridomas secretores de isotipos de IgM requerirán mayores cantidades de componentes estructurales para esta proteína, que las necesarias para síntesis de AcM tipo IgG; siendo favorecidas en el primer caso con el empleo de un medio rico en aminoácidos como el RPMI-1640 y suplementado con SFB, a diferencia del uso de PFHM que se suplementa con insulina, en la mejor de las variantes.

En un trabajo realizado por Faife y col., en 2008, investigadores del CIM, sobre el efecto de la adaptación de células NS0 a medios libres de proteínas concluyen que existe un comportamiento similar en los parámetros cinéticos de cultivos en PFHM y DMEM/F-12, medios libres de suero, así como las características de afinidad y moleculares de los AcM producidos permanecen inalterables y similares.

Es válido resaltar que, hasta el momento, en los trabajos realizados en LABEX para producción de AcMs no se utiliza el DMEM/F-12, aunque si resulta incorporado en el diseño del medio MyeloCIM: Plataforma MB03 (**Fig. 10**).

Como se resume en los trabajos desarrollados en LABEX (**Fig. 11**) los suplementos utilizados para la producción de anticuerpos monoclonales anti-B por diferentes tecnologías *in vitro*, se pueden mencionar el SFB, la insulina, L-glutamina.

En las investigaciones de Casado en 2017, también se alcanzan muy bajos resultados en la producción del anticuerpo, medido indirectamente por la potencia alcanzada para el sobrenadante anti-B (≤ 256), en medio PFHM-II suplementado con insulina y 8mM de L-glutamina (**Anexo 7.**). Aunque varios estudios han demostrado que las células de hibridomas suelen ser altamente dependientes de la glutamina como sustrato, la adición de glutamina al medio de cultivo en el estudio no influyó sobre los parámetros cinéticos del Hibridoma anti-B. Sin embargo, la

adición de insulina tuvo influencia positiva en la concentración celular máxima, posiblemente porque esta hormona posee efectos pleiotrópicos reguladores del estado proliferativo de las células, pero no es favorable a la producción de AcM y por ende su actividad biológica (Vicente, 2015).

Para eliminar las desventajas que introduce el uso del SFB en el desarrollo del proceso productivo de obtención del AcM anti-B, se realiza la adaptación de hibridomas de medio RPMI-1640 a medio PFHM. Se escogió este medio de cultivo porque es una formulación libre de sueros y proteínas, diseñada específicamente para el cultivo de este tipo de células, además su precio resulta tres veces inferior con respecto a la formulación de RPMI1640 + 8% SFB (Galván, 2013; Victores y col., 2008).

A pesar de que el SFB contiene varios factores promotores del crecimiento celular, en estudios de diversos autores se ha reflejado que este componente presenta varias desventajas para el establecimiento de procesos productivos (Brunner y col., 2010). Su uso resulta una fuente potencial de contaminantes, incluyendo priones, virus y micoplasmas. Otro factor relevante es el precio en el mercado, pues un litro del reactivo en el 2005 se cotizaba como promedio entre 115 y 135 USD y actualmente, alcanza valores entre 200 y 500 USD; constituyendo cerca del 70 % del costo total de la formulación del medio de cultivo (www.fishersci.es).

- ✚ El Suero Fetal Bovino (SFB), es una mezcla compleja de albúminas y factores de crecimiento, es uno de los componentes más importantes de los medios de cultivo celular y sirve como fuente de aminoácidos, proteínas, vitaminas (particularmente vitaminas liposolubles como la A, D, E y K), carbohidratos, lípidos, hormonas, factores de crecimiento, minerales y oligoelementos.

Por estas razones, la tendencia actual en la industria biotecnológica es a la eliminación de este componente a través de la adaptación de líneas celulares a medios de cultivos libres de suero, con composición química definida, reduciéndose en un 80 % los costos de los mismos (Hernández, 2015).

Otros suplementos recomendados en cultivos celulares e incorporados a la Plataforma de Medios del CIM, en MB04 y MB010, fueron (**Fig. 10**):

- ✚ *CellBoostTM*: Es un kit de suplementos de cultivo celular que provee 6 suplementos. Es propiedad de *HyCloneTM GE HealthCare*. Estos suplementos son químicamente definidos, no poseen proteínas y no tienen compuestos derivados de animales. Para línea celular hibridoma se recomiendan tres de estos suplementos: CB3, CB5 y CB6.

El CB3 contiene aminoácidos, vitaminas, glucosa, elementos traza e hipoxantina/timidina. El CB5 y CB6 contiene aminoácidos, vitaminas, glucosa, elementos traza, lípidos, colesterol e hipoxantina/timidina (GE Healthcare, 2016), En el **Anexo 8**. se refieren a los componentes de las variantes de Cell Boost y las células para las que se recomiendan.

Aunque el CB3 es el recomendado para hibridoma de mieloma, se pretende incrementar la incorporación de nutrientes a los medios basales libres de suero empleados en el cultivo anti-B, que además sea afín a la línea celular de origen murino NS0; por cuanto la fusión con linfocito incorpora la complejidad metabólica de este y, por tanto, mayores requerimientos nutricionales.

Es por eso que se selecciona en la Plataforma del CIM el CB5, recurriendo a la versatilidad de uso para células NS0 o CHO.

✚ Free Add es un suplemento químicamente definido, libre de componentes humanos y animales, libre de factores de crecimiento, libre de hidrolizados, libre de virus y TSE/BSE. En la información proporcionada por el fabricante, los resultados muestran una comparación entre el uso de SFB y Free Add en tres líneas celulares diferentes: CHO, RLEC, NIH/3T3 (*Biowest, 2016*). Los mejores resultados de concentración de células vivas para el Free Add fueron en la línea RLEC (célula epitelial de hígado de rata), en células crecidas en medio mixto de nutrientes Ham-F12. Teniendo en cuenta que este medio es recomendado para el cultivo de hibridomas, se puede sugerir el uso del suplemento Free Add para el medio Ham-F12 o el DEMEM/F-12.

Por lo que, atendiendo a los análisis realizados, las experiencias existentes y la propuesta de tecnología *in vitro* a utilizar; a continuación, presentamos en un esquema la plataforma de medio de cultivo celular y suplementos que se propone en este trabajo (**Anexo 9.**). La misma cuenta con varios medios de cultivo basales para la línea celular hibridoma murino Clon BSM-4, considerando medios propios e importados, mezclas de estos y suplementos proteicos o químicamente definidos.

4.2. Adaptación del hibridoma anti-B a diferentes medios de cultivo celular.

El proceso de obtención de la IFA sobrenadante anti-B ingrediente principal para la formulación del producto *ior Hemo-CIM* anti-B en LABEX, está establecido a partir de la fermentación del hibridoma anti-B en frascos Rotatorios de 850 cm² con el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 8% de suero. Este mismo proceso productivo es utilizado actualmente en la obtención de la IFA sobrenadante anti-D y anti-D débil Du ingredientes principales del *ior Hemo-CIM* anti-D, estos dos últimos hibridomas cuentan con títulos de potencia relativamente altos en base a lo estipulado por sistema de gestión de calidad de Labex, no así sucede con el hibridoma anti-B, del cual se obtienen títulos de potencia bajos o cercanos al límite mínimo estipulado por sistema de calidad de Labex.

Históricamente se ha adaptado el hibridoma anti-B a medios libres de suero y de proteínas algunos suplementados o no suplementados obteniéndose resultados satisfactorios en algunos y otros no satisfactorios con el objetivo de sustituir o disminuir el empleo del suero fetal bovino de algunos procesos productivos en los que su demanda aumenta gradualmente porque el empleo del suero fetal no sostiene la rentabilidad de éste, pero también la baja productividad del hibridoma es un punto influyente en el rendimiento productivo del proceso y la rentabilidad.

Teniendo en cuenta lo explicado antes se eligieron medios de cultivos basales para adaptar el hibridoma anti-B que comúnmente se cultiva en RPMI 1640 suplementado con 8% de SFB, éstos están presentes en la plataforma de medios de cultivos existente en el CIM-Labex: PFHM-II, MyeloCIM y DMEM/F12 suplementada con 8% de SFB, algunos de estos utilizados en trabajos anteriores en adaptaciones, cinéticas de cultivos celulares o en procesos fermentativos en biorreactores de Ola y Rollers, tales como el PFHM-II y MyeloCIM.

Algunos de estos trabajos tales como el realizado por Zorrilla en 2011 en el que el hibridoma anti-B se adaptó a PFHM-II, en el cual se obtuvieron resultados satisfactorios en cuanto crecimiento y un aumento de la productividad del hibridoma anti-B obtenido comparado con el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 8 % medio de cultivo establecido para la producción de sobrenadante anti-B, la productividad aumento de 32,05 µg/mL en RPMI 1640 a 73,35 µg/mL en PFHM-II, se extendió hasta 33 días, un tiempo de duplicación de 19h, estimándose 41,6 generaciones celulares transcurridas (Zorrilla, 2011) (**Anexo 10.**).

Por otra parte, en la adaptación realizada por Miranda del Hibridoma t4 anti-CD4 a PFHM y MyeloCIM a partir de medio RPMI+ 8% de SFB, se reportaron valores de productividad superiores 8,7 y 3,5 veces respectivamente; explicando que al retirar el SFB de la formulación del medio de cultivo, se eliminaron proteínas séricas que incrementaban la producción celular y fueron incorporados nuevos elementos que aumentaron la formación de anticuerpos, para esta línea celular en particular, comportamiento que no coincide con los resultados de este trabajo (Miranda, 2011) (**Anexo 5.**).

En estas referencias anteriores se emplea un medio de cultivo libre de suero y proteína que es el PFHM-II que sustituye al medio que comúnmente se utiliza en el cultivo del hibridoma anti-B que es el RPMI 1640 suplementado con 8% de SFB, es decir que los autores sustituyen el medio basal y el suplemento, en nuestra investigación elegimos emplear este mismo medio de cultivo, PFHM-II, y el DMEM/F-12 suplementado con 8 % de SFB, en este caso sustituimos el medio basal y no el suplemento por las ventajas ya conocidas de éste, ahora bien, el DMEM/F-12 un medio basal extremadamente rico y complejo, utilizado para propiciar el crecimiento de una amplia gama de tipos de líneas celulares y estudiar sus características biológicas, este medio basal también comúnmente utilizado en el desarrollo y confección de líneas celulares de hibridoma, también es utilizado en el CIM como componente de una mezcla de medio de cultivo junto al PFHM-II en la producción del anticuerpo Racotumomab en la escala de 41 litros en el 2016 (Rivera, 2016; Castillo, 2015).

La estabilidad en el crecimiento y la productividad de la línea celular es un factor importante a tener en cuenta en la etapa de adaptación de líneas celulares cultivadas en medios basales suplementados con SFB a medios libres de suero o libres de proteínas. Se ha demostrado que la inestabilidad es altamente frecuente, y en algunos casos transitoria (Bae y col., 1995; Merritt y Palsson, 1993; Lee y col. 1991). Ésta se debe a alteraciones que pueden ser de origen genético, como mutaciones, la inserción, supresión o pérdida del cromosoma causada por los reordenamientos genéticos. Las alteraciones pueden también ser inducidas por la variación de las condiciones ambientales, tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto (DO) o limitaciones de nutrientes. Todas las alteraciones pueden conducir al desarrollo de células hibridomas con diferentes características fenotípicas, tales como, pérdida de la capacidad para la producción de anticuerpos, la formación de variantes de la cadena pesada, la formación de variantes de idiotipo o la producción incompleta de cadenas pesadas o ligeras (Coco-Martin, 1992).

Barnes también informa que las poblaciones no productoras aparecen debido a alteraciones genéticas relacionadas con la síntesis del anticuerpo a niveles de transcripción (mutaciones, pérdida de genes, codificación de la proteína), traducción y secreción de la proteína (Barnes, 2003). De ahí que previamente se debe asegurar la estabilidad genética de una línea celular que

va a ser utilizada en procesos industriales, ya que reviste gran importancia desde puntos de vistas de la consistencia, la robustez y el impacto sobre los costos del proceso.

El hibridoma anti-B clon BMS 4 empleado en esta investigación se adaptó a los medios libres de proteína PFHM II y MyeloCIM respectivamente, a partir del método de adaptación secuencial. El proceso de adaptación del Hibridoma anti-B al medio de cultivo PFHM II duró 52 días, se alcanzó una concentración máxima de células vivas de 0.921×10^6 cel/mL, la velocidad específica de crecimiento máxima tuvo un valor de 0.023 h^{-1} , un tiempo de duplicación de 29.96 h y el número de generaciones transcurridas fue de 42 (**Tabla 7**). El desarrollo de la adaptación se observa en el esquema presentado en la (**Fig. 12**).

El proceso de adaptación del hibridoma anti-B al medio de cultivo MyeloCIM duró 63 días, se alcanzó una concentración máxima de células vivas de 0.78×10^6 cel/mL, la μ_{max} con un valor de 0.020 h^{-1} , un tiempo de duplicación de 35.23 h y el número de generaciones transcurridas fue de 43 (**Tabla 7**). El desarrollo de la adaptación se observa en el esquema presentado en el **Fig. 13**.

El método de adaptación directo fue el utilizado en el proceso de adaptación al medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8 % SFB, donde este proceso de adaptación del hibridoma anti-B duró 27 días, se alcanzó una concentración máxima de células vivas que sobrepasa el 1×10^6 cel/mL, la velocidad específica de crecimiento máxima con un valor de 0.030 h^{-1} , un tiempo de duplicación de 23.57 h y el número de generaciones transcurridas fue de 28 (**Tabla 7**). El desarrollo de la adaptación se observa en el esquema presentado en el **Fig. 14**.

De acuerdo con los resultados del cálculo de las variables cinéticas obtenidas en el proceso de adaptación del hibridoma anti-B, tales como la velocidad específica de crecimiento máxima, la concentración máxima de células vivas y otros parámetros, el mejor desempeño lo tuvo el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8% de SFB, resultados observados en la **Tabla 7**, esto se lo debemos a la presencia de una gama de nutrientes que aporta el SFB, así como factores y hormonas de crecimiento entre otros nutrientes y micronutrientes importantes, no olvidar la complejidad de la formulación del medio de cultivo DMEM/F-12 el cual es un medio complejo y rico en factores de crecimiento. Sólo en los cultivos en medio DMEM/F12 se refleja una tendencia al incremento de la velocidad específica de crecimiento máxima, como muestra el **Fig. 15**.

Este desempeño tan bueno en el proceso de adaptación del hibridoma anti-B en el medio DMEM/F-12+8% SFB no se desarrolló en los otros medios de cultivo, PFHM-II y MyeloCIM, donde se obtuvieron velocidades de crecimiento específica máxima y concentraciones de células vivas bajas de acuerdo a las obtenidas en el DMEM/F-12+8% SFB, esto se justifica por la no suplementación con suero fetal bovino de estos dos medios de cultivo, aunque se observa la misma tendencia al incremento de la velocidad específica de crecimiento máxima en el medio de cultivo PFHM-II en la **Fig. 15**.

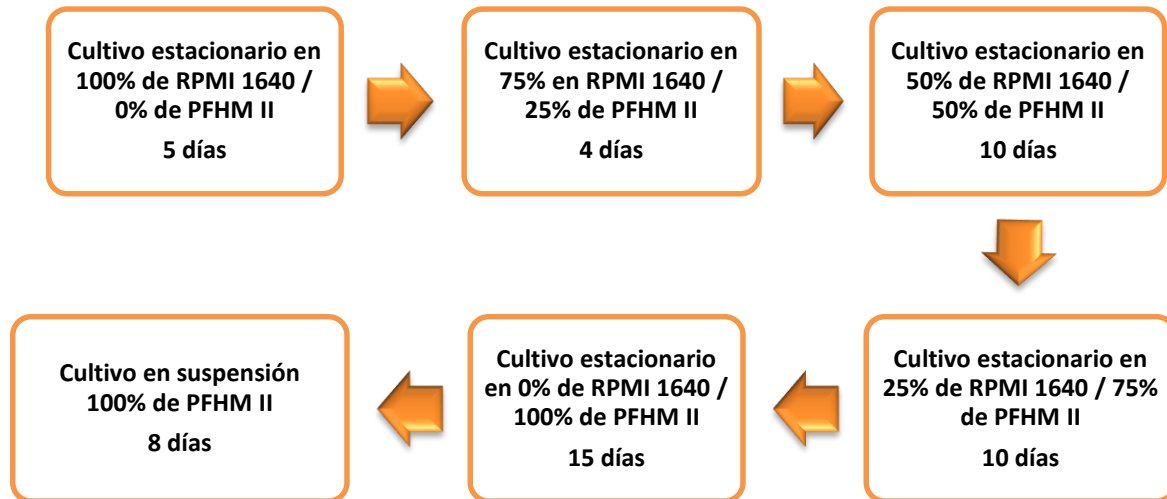


Figura 12. Esquema de la adaptación del hibridoma al medio PFHM-II



Figura 13. Esquema de la adaptación del hibridoma al medio de cultivo MyeloCIM duró 63 días.

Tabla 7. Resumen de la adaptación del hibridoma anti-B a los diferentes medios de cultivo.

Medio basal	μ_{max} (h^{-1})	T_d (h)	N_g	X_v (cel/mL)
PFHM-II	0.023 ^b	29.96 ^b	42	9.21E+05 ^b
MYELOCIM	0.020 ^b	35.23 ^c	43	7.80E+05 ^b
DMEM/F12	0,030^a	23.57^a	28	12,7 E+05^a

CV de los parámetros medidos menor del 10%

Letras diferentes, significan diferencias estadísticamente significativas

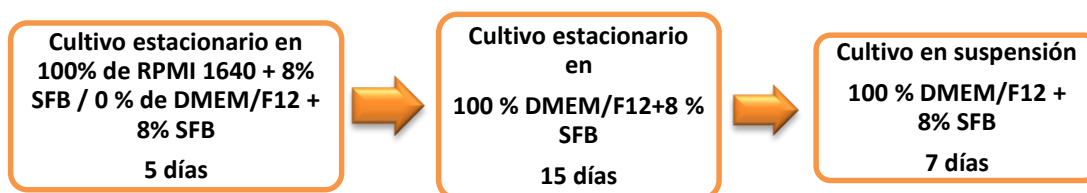


Figura 14. Esquema de la adaptación del hibridoma al medio DMEM/F12.

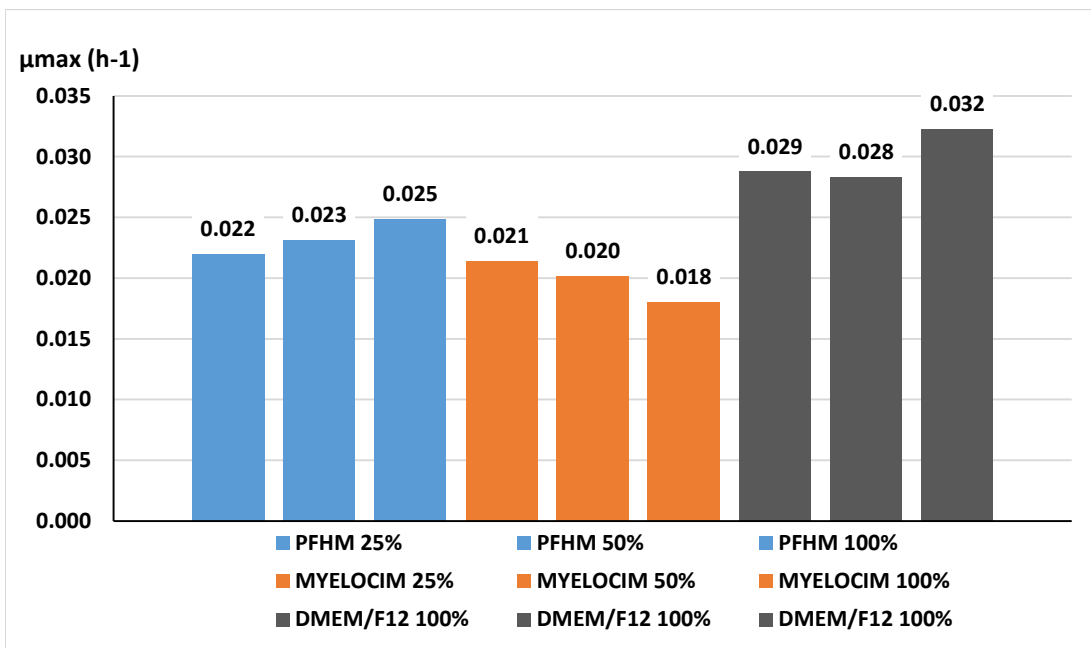


Figura 15. Velocidad específica de crecimiento máxima de la adaptación de los cultivos en diferentes medios.

Los resultados de las variables cinéticas en el desarrollo del proceso de adaptación del hibridoma anti-B en los diferentes medios de cultivo se resumen en la **Tabla 7**.

También en el proceso de adaptación se determinó los parámetros de calidad, tales como la potencia de aglutinación, avidéz e intensidad, durante el reconocimiento en dos fenotipos afines (sangre B y AB). En la **Fig. 16** se muestran los resultados de la actividad biológica del sobrenadante anti-B obtenido en los diferentes medios de cultivo propuestos.

Los resultados evidencian que en el medio de cultivo que mejor resultado de actividad biológica reportó fue el DMEM/F12 + 8% SFB con valores de potencia de 1024 y 2048 en sangre tipo B, avidéz de 16 s y una intensidad de 2+ en 1024 y 1+ en 2048, en sangre AB se obtuvieron valores de potencia de 256 y 512, una avidéz 18 s y una intensidad de 2+ en 256 y 1+ en 512, reafirmando el cumplimiento con las especificaciones de calidad de aceptación para la formulación del Hemoclasificador anti-B en Labex.

Los resultados de actividad biológica en PFHM-II fueron, potencia de 64 y 128 en sangre tipo B, una avidéz de 14 s y una intensidad de 2+ en 64 y 1+ en 128, en sangre tipo AB, se obtuvo una potencia de 32 y 64, con una avidéz de 10 s y una intensidad 2+ en 32 y 1+ en 64, en este medio de cultivo el sobrenadante anti-B no cumplió con las especificaciones de calidad de aceptación establecidos por Sistema de Gestión de Calidad de LABEX para el sobrenadante anti-B.

En el medio de cultivo MyeloCIM se obtuvieron los valores más bajos de actividad biológica, con una potencia de 32 y 64 en sangre B, una avidéz mayor del límite de 30 s y una intensidad de 2+ en 32 y 1+ en 64, en la sangre AB se obtuvo una potencia de 8 y 16, una avidéz que también supera el límite de aceptación de 30 s y una intensidad 2+ en 8 y 1+ en 16, incumpliendo también con las especificaciones de calidad para la aceptación para el sobrenadante anti-B. Esto constituye que fue el medio de más bajo crecimiento de las células y producción de AcM en sobrenadante; deduciendo afectaciones en el metabolismo y mecanismo de síntesis de estas inmunoglobulinas.

Si se comparan los parámetros que caracterizan este cultivo con los resultados en RPMI 1640 + 8% SFB o en PFHM-II realizados por Casado en el 2017 usando el mismo clon de hibridoma, se observaron que los valores de concentración máxima de células viables obtenidos en el medio de cultivo DMEM-F12 + 8% SFB ($D-1,27 \times 10^6$ cel/mL vs $R-1,18 \times 10^6$ cel/mL y $P-1.4 \times 10^6$ cel/mL) son cercanos con respecto al RPMI 1640 + 8% SFB pero ligeramente más baja con respecto a la obtenida en la adaptación al medio de cultivo PFHM-II, aunque la velocidad de específica de crecimiento máxima alcanzada en RPMI 1640 de 0.033 h^{-1} y PFHM-II 0.031 h^{-1} son ligeramente superiores a la obtenida en DMEM/F12 + 8% SFB, en el caso de los resultados de actividad biológica obtenidos, estos son bajos con respecto a los del RPMI1640 con una potencia de 4096 en sangre B y 2048 en sangre AB, no así en el PFHM-II con una potencia de 128 en sangre B y sangre AB resultando mucho más alta la del DMEM/F-12, por lo que decimos que en este medio cultivo, DMEM/F-12, el hibridoma tuvo un comportamiento satisfactorio en cuanto a crecimiento y productividad.

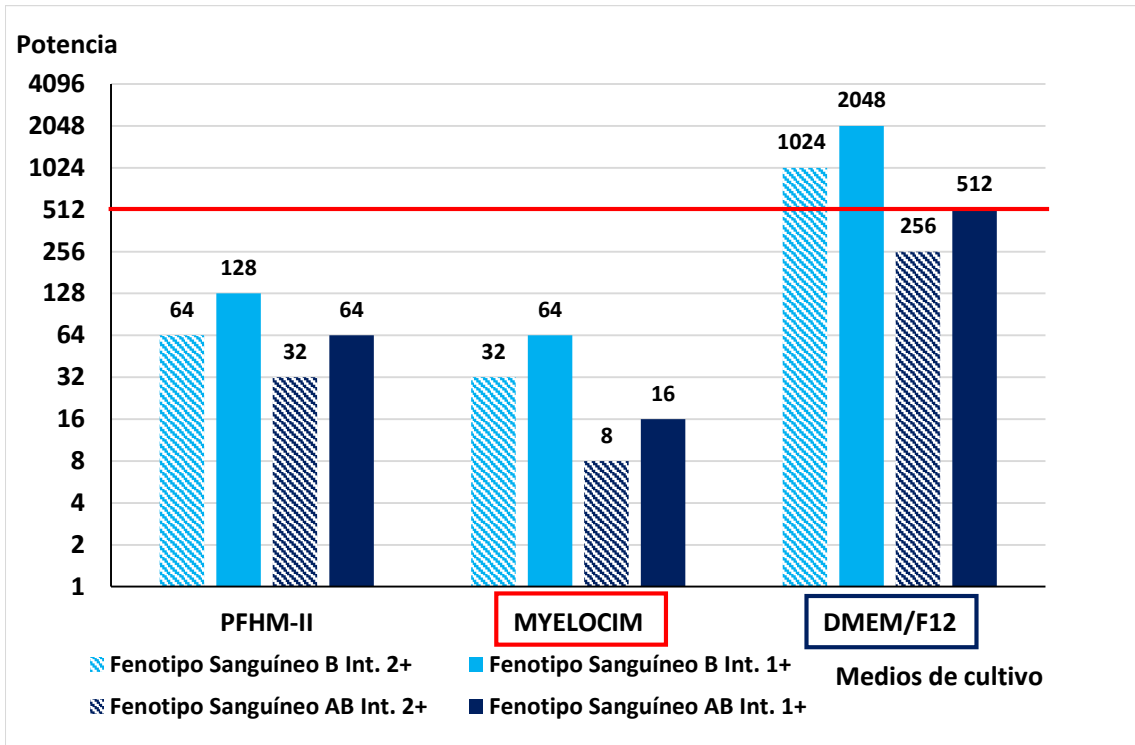


Figura 16. Resultados de la Actividad Biológica de los sobrenadantes obtenidos de la adaptación a los medios de cultivo.

Es bueno significar que el medio MyeloCIM resulta una variante que contiene los componentes del RPMI 1640 y DMEM/F12, por lo que cabría haber esperado una mejora en el desarrollo del cultivo.

Por otra parte, es bueno explicar el desempeño tan malo del hibridoma en el medio de cultivo MyeloCIM, en el cual la insulina es uno de los componentes del medio de cultivo MyeloCIM y que en este caso se puede inferir que no es bueno para esta línea celular de hibridomas. Esto puede deberse a que el medio MyeloCIM es el único medio de cultivo de los medios ensayados que la posee la insulina en su formulación. La insulina es la hormona más común para usar como suplemento de medios de cultivo, para casi todas las líneas celulares incluidas los hibridomas, se conoce su actividad en el transporte de sustrato en la membrana, así como en la biosíntesis del ARN, proteínas y ácidos grasos. Los hibridomas también necesitan de insulina en medios libres de suero, de no usar se inhibe completamente el crecimiento.

Estudios realizados en 1995 por Zhou y Hu cuestionan la necesidad de agregar insulina en medios libres de suero para el cultivo de hibridomas, pues encontraron que añadir insulina no afecta ni el crecimiento celular ni la producción de anticuerpos, ósea, que no hay diferencias en el crecimiento y productividad del hibridoma en cultivo, utilizando un medio de cultivo libre suero con o sin insulina (Zhou y Hu, 1995; Meleady, 1997), por lo que su efecto resulta contradictorio.

Vicente reporta la obtención de clones del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal Racotumomab (monoclonal tipo murino), donde la insulina por sí sola, no tuvo influencias significativas sobre la productividad del anticuerpo, comparada con otros suplementos como el suero y la glucosa que fueron adicionados a la mezcla de los medios PFHM+DMEM/F12 (Vicente, 2015).

Teniendo en cuenta los resultados insatisfactorios de los criterios del proceso de adaptación del hibridoma en el medio de cultivo MyeloCIM para avanzar a la siguiente etapa de caracterización cinética, como concentración celular y actividad biológica, se decide descartar este medio de cultivo de la caracterización cinética. En este medio de cultivo el sobrenadante no cumple con los requisitos de calidad mínimo necesario de potencia, avidez e intensidad. El medio tiene bajos niveles de velocidad específica de crecimiento debido a bajas concentraciones de células vivas. También de esta manera se corrobora que la suplementación de medio de cultivo con insulina no es factible para el cultivo de este hibridoma.

Después de lo antes explicado se concluye previamente que el hibridoma anti-B se adaptó satisfactoriamente en los medios DMEM/F-12 + 8% de SFB y PFHM-II de acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a concentración máxima de células vivas, velocidad específica de crecimiento máxima y potencia e aglutinación en sangre podemos avanzar a la siguiente etapa de caracterización cinética del hibridoma anti-B en los medios de cultivo DMEM/F-12 + 8% de SFB y PFHM-II incluyendo al medio de cultivo que se utiliza comúnmente en la obtención de sobrenadante anti-B, el RPMI 1640+ 8% SFB como referencia.

4.3. Caracterización cinética del hibridoma anti-B en los diferentes medios de cultivo.

La caracterización cinética del Hibridoma anti-B, se realizó en cultivos agitados en modo batch en frascos rotatorios Rollers en los medios de cultivo RPMI 1640 + 8% SFB, el cual constituye una referencia objetiva para la evaluación del comportamiento del hibridoma adaptado a otros medios de cultivo, un medio libre de proteína PFHM-II y otro medio de cultivo DMEM/F-12 + 8% SFB. El experimento tuvo 3 réplicas en cada medio de cultivo en condiciones idénticas en el modo de operación batch, además de ser la variante más sencilla, permite explorar las potencialidades reales de la línea celular para un ambiente específico, y sirve como punto de partida para desarrollar estrategias productivas (Miranda, 2011).

En la **Fig. 17** se muestra la curva de crecimiento celular de anti-B en el medio de cultivo RPMI-1640 + 8% SFB, donde se representa el desarrollo y la variación de la concentración de celular y la viabilidad del cultivo en el tiempo. En la curva de concentración de células vivas (Xv) no se distingue la fase de latencia o adaptación como se observa en la **Fig. 7** del **Epígrafe 2.4.4** en una curva de crecimiento estándar debido a que la línea celular para estas condiciones no necesita adaptarse pues tiene memoria genética y la maquinaria enzimática está adaptada a los nutrientes en este medio de cultivo. El hibridoma se desarrolla directamente en la fase exponencial llegando a su concentración celular máxima promedio a las 48 h en cultivo con un valor de $1,205 \times 10^6$ cel/mL. A partir de las 72 h comienza la fase de muerte del cultivo bajando en igual proporción la viabilidad del cultivo, pero todavía con un valor por encima de 80%. En este medio de cultivo la línea celular también mostro un valor promedio de velocidad de específica de crecimiento máxima de 0.029 h^{-1} , con un tiempo de duplicación Td de 24 h y numero de generaciones Ng de 6, en la Tabla 7 se resumen estos parámetros cinéticos.

En la **Fig. 18** se muestra la curva de crecimiento celular del hibridoma anti-B en el medio de cultivo DMEM/F12 + 8% SFB. En la curva de concentración de células vivas (Xv) tampoco se identifica la fase de latencia normal en el cultivo, esto se debe a que la línea celular aparte de que posee memoria genética, su maquinaria enzimática metabólica está completamente adaptada a este nuevo medio de cultivo mostrando la eficacia del proceso de adaptación. La línea celular en este medio de cultivo alcanza una concentración celular máxima promedio a las 72 h con un valor de $2,1 \times 10^6$ cel/ml mostrando la fase exponencial de la curva. A partir de las 96 h comienza la fase de muerte, mostrando un mantenimiento celular prolongado en tiempo total de 168 h tiempo de duración mayor de la cinética en comparación con los otros dos medios de cultivo, lo cual es favorable para la producción de productos asociados al mantenimiento. También en este medio de cultivo el hibridoma alcanzó un valor promedio de velocidad de específica de crecimiento máxima de 0.027 h^{-1} , con un tiempo de duplicación Td de 26 h y numero de generaciones Ng de 7, resumiendo es valores de parámetros cinéticos en la **Tabla 8**.

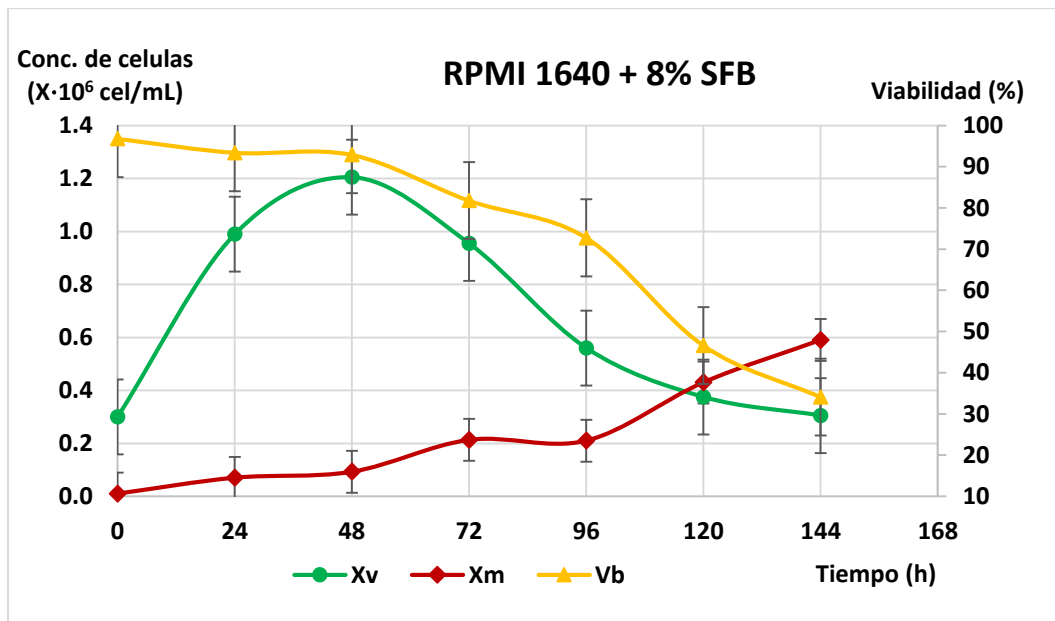


Figura 17. Curva de crecimiento celular del hibridoma anti-B en medio de cultivo RPMI-1640 + 8% SFB.

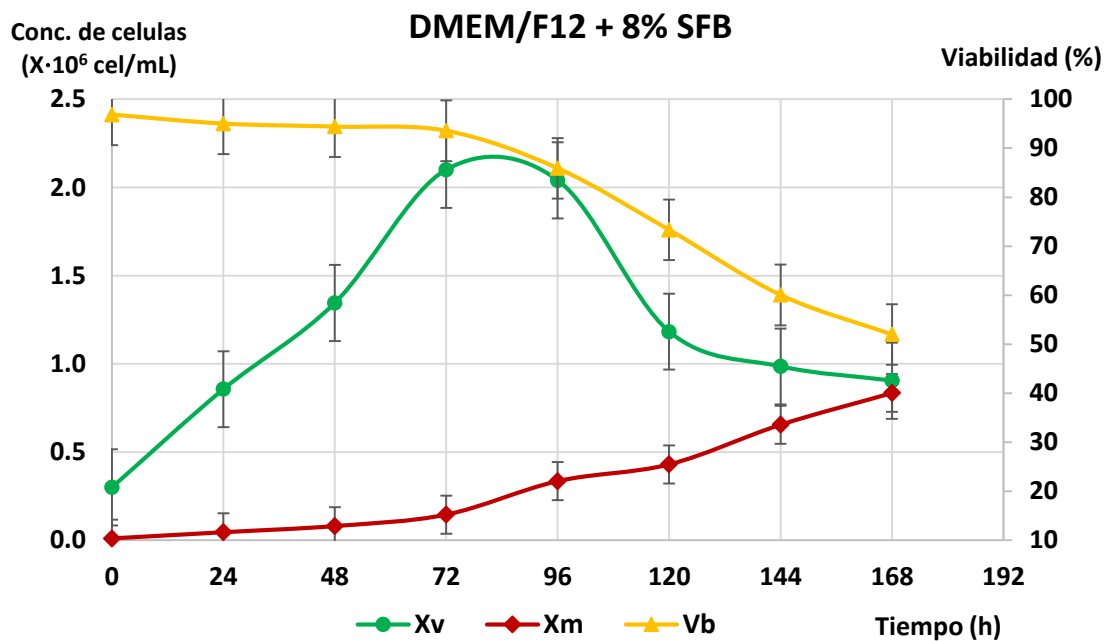


Figura 18. Curva de crecimiento celular del hibridoma anti-B en medio de cultivo DMEM/F-12 + 8% SFB.

Tabla 8. Resumen de los parámetros de la cinética del hibridoma anti-B en diferentes medios de cultivo.

Medio de Cultivo	μ máx. (h^{-1})	Td (h)	Ng	Xv máx. ($\times 10^6$ cel/mL)
RPMI-1640	0.029 ± 0.002^b	24 ± 4	6 ± 0^b	1.205 ± 0.08^c
DMEM/F12	0.027 ± 0.007^a	26 ± 6	7 ± 2^a	2.10 ± 0.04^a
PFHM-II	$0,036 \pm 0.001^b$	19 ± 3	8 ± 0^b	1.715 ± 0.04^b

Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas

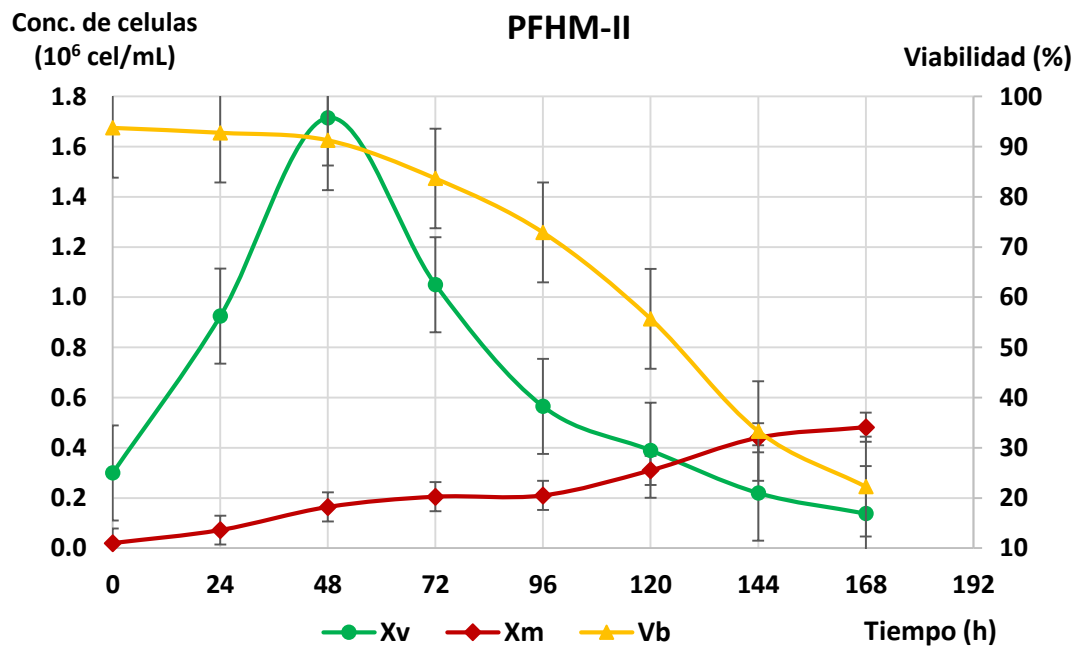


Figura 19. Curva de crecimiento celular del hibridoma anti-B en el medio de cultivo PFHM-II.

En la **Fig. 19** se muestran los resultados obtenidos en los experimentos cinéticos en medio PFHM-II. En este medio libre de proteínas a las 48 h se alcanzó una concentración celular máxima promedio de hasta 1.715×10^6 cel/ml, ligeramente superior al RPMI-1640 y en el mismo tiempo que este. En este medio de cultivo se alcanzó un valor promedio de velocidad de específica de crecimiento máxima de 0.036 h^{-1} , con un tiempo de duplicación Td de 19 h y número de generaciones Ng de 8, resumiendo los valores de parámetros cinéticos en la **Tabla 8** sin diferencias significativas, excepto por el incremento de la concentración máxima de las células vivas.

En la **Fig. 20** se muestra una comparación entre las curvas de concentración de las células vivas y viabilidad del hibridoma anti-B en los medios de cultivo representando el mejor desarrollo en cultivo el medio de cultivo DMEM/F-12 + 8% SFB, llegando a la mayor concentración de células vivas a las 72 h entre los tres medios de cultivo y su viabilidad tarda más en caer rápidamente, no así en los medios de cultivo RPMI 1640 + 8% SFB y PFHM-II que alcanzan rápidamente su máxima concentración de células vivas a las 48 h y su viabilidad también cae precipitadamente hecho que explica porque los medios de cultivo RPMI 1640 + 8% SFB y PFHM-II tienen velocidades específicas de crecimiento máximas mayores que la del DMEM/F-12 + 8% SFB, como se representa en la **Tabla 8**.

Esto corrobora lo rico y complejo que es este medio de cultivo y que su composición en cuanto a nutrientes promueve el crecimiento y cumple un papel eficaz en el mantenimiento celular de esta línea de hibridoma, lo cual constituye una clara ventaja en cuanto a la capacidad de producción del hibridoma, que lógicamente éste cuando tarda más en disminuir drásticamente su viabilidad en el tiempo se obtiene un acumulado mayor de producto en este caso el AcM de tipo IgM. Según Hayter, durante la fase exponencial, el metabolismo del hibridoma tiene una tendencia a aprovechar la mayor parte de la energía que obtienen de los nutrientes en la producción de anticuerpos teniendo como consecuencia la disminución de la velocidad de crecimiento (Hayter y col., 1992), hecho que se demostrara en la etapa de la medición de la actividad biológica con la potencia alcanzada por el sobrenadante obtenido de la caracterización cinética.

En el estudio cinético realizado por Casado en 2017 en el medio de cultivo PFHM fue superior al obtenido en el medio RPMI, infiriéndose que la adaptación del Hibridoma anti-B al medio libre de proteínas influyó en la mejora de la concentración máxima de células vivas, con un promedio de $2.51 \cdot 10^6$ cel/ml, valor dos veces superior al obtenido en la cinética con suero de $1.18 \cdot 10^6$ cel/ml. Se obtuvieron valores de velocidad de crecimiento máxima alrededor de 0.03 h^{-1} en ambos medios. La comparación de los valores del tiempo de duplicación, los cuales están relacionado directamente con μ , muestra que en ambos cultivos fueron muy similares cercanos a 21.4 h.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio cinético comparados con los de Casado en 2017 podemos decir que son ligeramente similares en cuanto a resultados infiriendo también que el cambio de medio basal sin eliminar el suero fetal bovino mejora de la concentración máxima de células vivas.

Como conclusiones previas el DMEM/F-12 resulto con el mejor papel en el estudio cinético alcanzando la mayor concentración máxima promedio de células vivas con $2,1 \times 10^6$ cel/ml a las 72h en cultivo en comparación con los otros medios de cultivo, también su viabilidad se mantuvo

por encima de 70% hasta las 120h que en comparación con los otros medios de cultivo a las 120h ya su viabilidad estaba por debajo de 60%. El tiempo total de la caracterización cinética en DMEM/F-12 + 8% SFB duro un tiempo total de 168h mientras que la del PFHM-II y RPMI 1640 + 8% SFB duró 144h evidenciando el buen mantenimiento y metabolismo celular lo cual es favorable en la acumulación del producto principal y que el hibridoma tiene una tendencia a aprovechar la mayor parte de la energía que obtienen de los nutrientes en la producción de anticuerpos teniendo como consecuencia una velocidad específica de crecimiento máxima menor que lo otros medio de cultivo hecho que comprobara en el medición de la actividad biológica.

4.4. Medición de la actividad biológica de los sobrenadantes anti-B obtenidos en la caracterización cinética.

La potencia de aglutinación, la cual se entiende como el recíproco de la mayor dilución de la muestra en que se puede observar aglutinación de hematíes, será el criterio de calidad para la selección de mayor importancia, porque su valor mantiene una relación proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en el sobrenadante de cultivo y es una medida de la productividad del hibridoma en cada medio y sistema de fermentación estudiado (Casado, 2017).

Este parámetro, potencia de aglutinación, junto a la avidez y la intensidad son los más importantes y decisivos en este trabajo, por eso el sistema de calidad de Labex se basa en estos parámetros para la liberación de los sobrenadantes hemoclasificadores, donde para el sobrenadante anti-B la potencia debe ser ≥ 512 , la Avidez ≤ 30 s y una intensidad de $\geq 2+$.

De la etapa de caracterización cinética del hibridoma se obtuvieron muestras de sobrenadantes de cada uno de los medios de cultivo ensayados al 4to, 5to, 6to y 7mo día en cultivo, a los cuales se le midió la actividad biológica, potencia, avidez e intensidad. A continuación, presentamos los resultados.

En la **Fig. 21** se muestran los resultados de actividad biológica de las muestras de sobrenadante anti-B cosechadas al 4to, 5to, 6to y 7mo día de la cinética en el medio de cultivo RPMI 1640 + 8% SFB, observándose que la potencia del sobrenadante al 4to día llega a un valor en el fenotipo sanguíneo B de 512 y para el fenotipo sanguíneo AB 256 para una intensidad final de 1+, una avidez mayor de 30 s en los dos fenotipos, al 5to día mejoró la potencia con un valor de 1024 en sangre B y 512 en sangre AB para una intensidad media de 1+ y la avidez mayor de 30 s cumpliendo los estándares de calidad por potencia, pero no por avidez. Para el 6to día la potencia disminuyó ligeramente con un valor de 512 en los dos grupos sanguíneos con una intensidad final de 1+ y una avidez de 7 s con una intensidad de 1+ en B y 2+ en AB evidenciando el cumplimiento de los parámetros de calidad.

Por lo que, al 7mo día mejoró la potencia llegando a 1024 en sangre B y 512 en sangre AB para una intensidad de 1+ en los dos grupos sanguíneos y la avidez llegó a 5 s con una intensidad de 3+ en sangre B y sangre AB también **cumpliendo con los estándares de calidad** establecidos. La potencia de los sobrenadantes colectados en algunos días pertinentes cumple con los estándares de calidad, pero la avidez no, el mejor día es el 7mo, pero ligeramente cerca del límite mínimo, hecho que pudiera ser desventajoso en el proceso posterior de formulación.

En la **Tabla 9** se resumen los resultados de potencia y avidez del sobrenadante anti-B obtenido en la cinética a partir del medio de cultivo RPMI 1640 + 8% SFB.

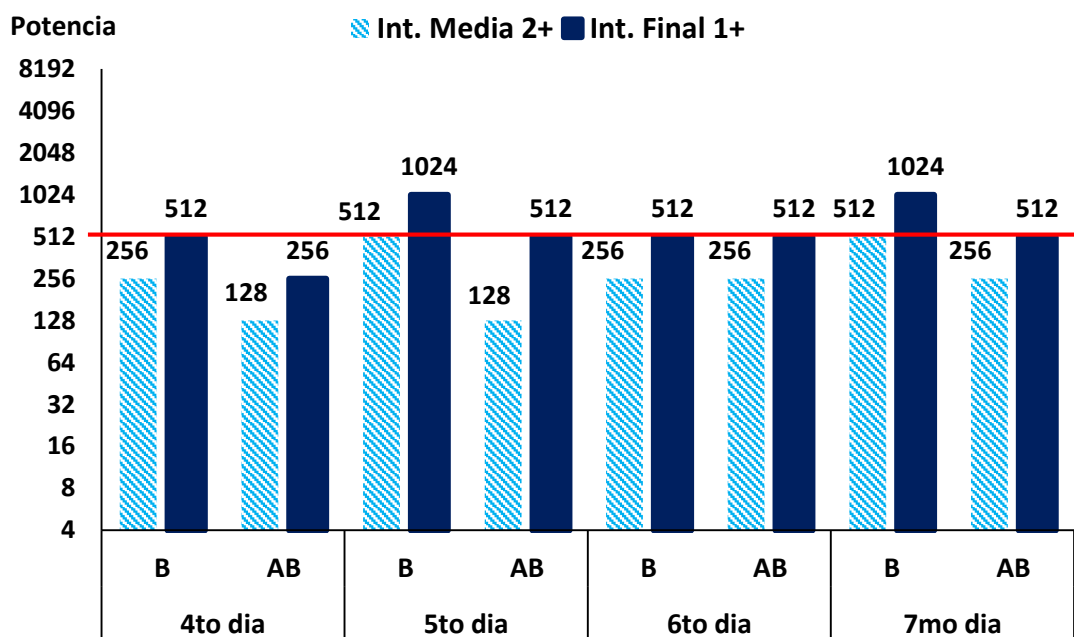


Figura 21. Resultados de la Actividad biológica del sobrenadante obtenido en la caracterización cinética en el medio RPMI 1640-F1 + 8% SFB.

Tabla 9. Resultados de potencia, avidéz e intensidad del sobrenadante obtenido de la caracterización cinética en el medio de cultivo RPMI 1640 + 8% SFB.

RPMI 1640-F1	4to día		5to día		6to día		7mo día	
Grupo Sanguíneo	B	AB	B	AB	B	AB	B	AB
Potencia/Int.1+	512	256	1024	512	512	512	1024	512
Avidéz/Int.	>30s	>30s	>30s	>30s	7s/1+	7s/2+	5s/3+	5s/3+

En la **Fig. 22** se muestran los resultados de actividad biológica de las muestras de sobrenadante anti-B recolectadas al 4to, 5to, 6to y 7mo día de la cinética en el medio de cultivo DMEM/F-12 + 8% SFB, mostrándose que al 4to día la potencia del sobrenadante en el fenotipo sanguíneo B ya alcanzaba un valor de 1024 y 512 para el fenotipo AB con una intensidad en los tipos de sangre de 1+, el valor de la avidéz llegó a 5 s con una intensidad de 4+ en sangre B y 7 s con una intensidad de 1+ para AB, al 5to día la potencia aumento considerablemente a 4096 con una intensidad de 1+ en los dos fenotipos sanguíneos y una avidéz de 5 s con una intensidad de 3+ en los dos fenotipo sanguíneos también.

Al 6to día la potencia disminuyó ligeramente con valores hasta 2048 en sangre B con una intensidad de 1+ y 1024 en AB con una intensidad de 1+, la avidéz mejoró a un valor de 4 s con una intensidad de 2+ en sangre B y 4 s con una intensidad de 3+ en AB, al 7mo día de muestreo la potencia del sobrenadante alcanzó un valor de 4096 con una intensidad de 1+ en sangre B y AB, una avidéz de 4 s con una intensidad de 4+ en los dos fenotipos sanguíneos evidenciando **el cumplimiento con los estándares de calidad** en todos los día que se recolecto las muestras.

En la **Tabla 10** se resumen los resultados de potencia y avidéz del sobrenadante anti-B obtenido en la cinética a partir del medio de cultivo DMEM/F-12 + 8% SFB.

En la **Fig. 23** se muestran los resultados de actividad biológica de las muestras de sobrenadante anti-B recolectadas al 4to, 5to, 6to y 7mo día de la cinética en el medio de cultivo PFHM-II, mostrándose que al 4to día los resultados de potencia son relativamente bajos, al 5to día aumento ligeramente la potencia, pero sin cumplir con el requisito establecido en el fenotipo AB y la avidéz no disminuyo de los 30 s, como se observa en la **Tabla 11**. Al 6to día se mantuvo el mismo resultado de potencia del 5to día, pero la avidéz resultó muy cercana al límite máximo de los 30 s con un valor de 25 s en sangre B y 22 s en sangre AB, siendo desfavorables a partir de este tiempo (**Tabla 11**).

Realizando un análisis de los resultados de la actividad biológica de las muestras sobrenadantes obtenidas de la cinética en los medios de cultivo, los resultados del DMEM/F-12 + 8% SFB superan a los resultados obtenidos de los otros medios de cultivo RPMI 1640 +8% SFB y PFHM-II, este último se obtuvieron los valores más bajos de potencia. En el medio de cultivo DMEM/F-12 + 8% SFB se obtuvieron valores máximos de potencia a partir del 5to día como se observa en la **Tabla 10** estos valores logrados con una concentración de células vivas de 1.18×10^6 cel/mL y una viabilidad de 73.3%, resultados relativamente buenos y ventajosos a la hora de definir una estrategia de producción de sobrenadante anti-B empleando algún modo de producción y si comparamos estos resultados con los de los otros medios de cultivos probados en la caracterización cinética que a partir del 5to comienza a disminuir su concentración de células vivas por debajo de 0.5×10^6 cel/mL y su viabilidad por debajo de 60% hecho que perjudica la utilización de éstos en un proceso de producción por la baja productividad que evidencia el hibridoma comprobado en la medición de la potencia exceptuando en el RPMI 1640 que su potencia cumple con los requisito de calidad pero muy cerca del límite.

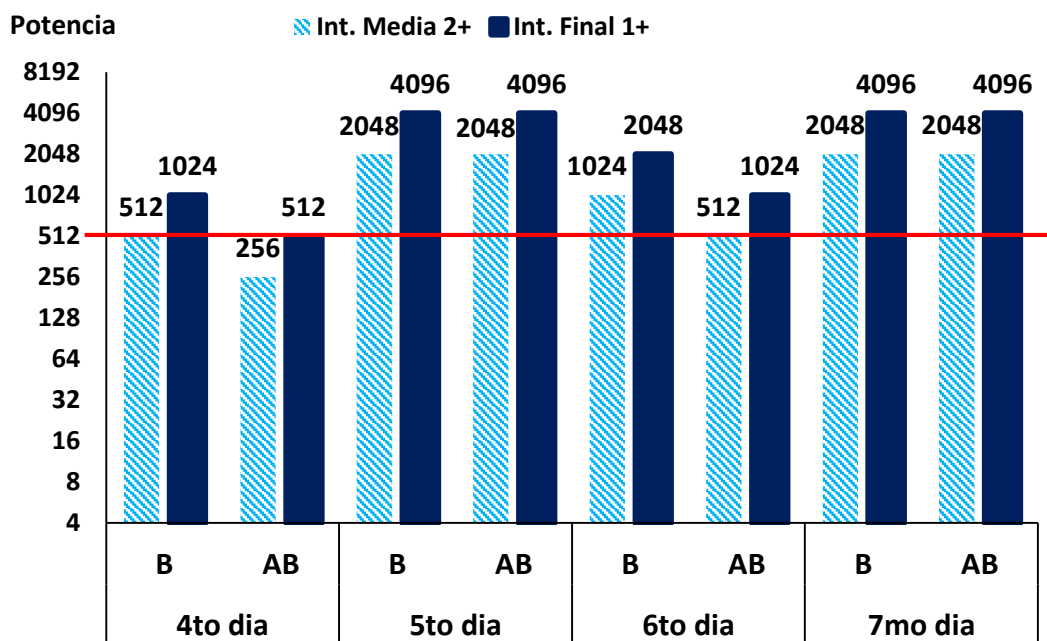


Figura 22. Resultados de la Actividad biológica del sobrenadante obtenido en la caracterización cinética en el medio DMEM/F-12 + 8% SFB.

Tabla 10. Resultados de potencia, avidez e intensidad del sobrenadante obtenido de la caracterización cinética en el medio de cultivo DMEM/F-12 + 8% SFB.

DMEM/F12	4to día		5to día		6to día		7mo día	
Grupo Sanguíneo	B	AB	B	AB	B	AB	B	AB
Potencia/Int.1+	1024	512	4096	4096	2048	1024	4096	4096
Avidez/Int.	5s/4+	7s/1+	5s/3+	5s/3+	4s/2+	4s/3+	4s/4+	4s/4+

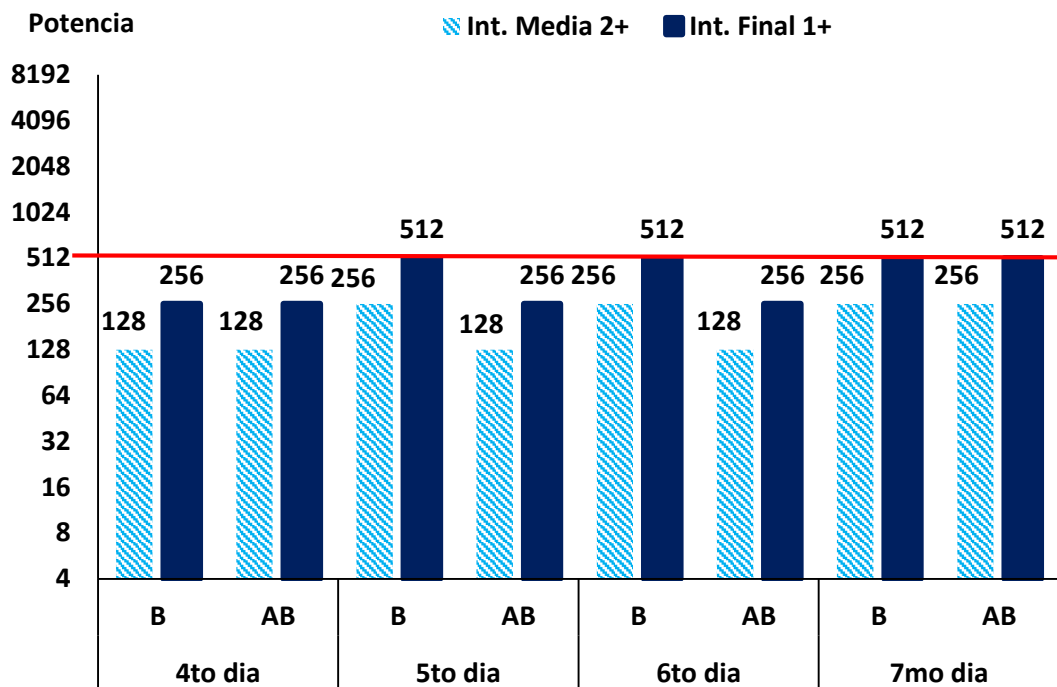


Figura 23. Resultados de la Actividad biológica del sobrenadante obtenido en la caracterización cinética en el medio PFHM-II.

Tabla 11. Resultados de potencia, avidéz e intensidad del sobrenadante obtenido de la caracterización cinética en el medio de cultivo PFHM-II.

PFHM-II	4to día		5to día		6to día		7mo día	
Grupo Sanguíneo	B	AB	B	AB	B	AB	B	AB
Potencia/Int. 1+	256	256	512	256	512	256	512	512
Avidéz/Int.	>30s	>30s	>30s	>30s	25s/1+	22s/1+	22s/1+	20s/1+

En el medio PFHM en comparación con el medio que normalmente se emplea en la producción del sobrenadante, RPMI 1640, se nota una pérdida de la productividad de la línea de hibridoma por los bajos resultados de potencias medidos, que puede deberse a la disminución de la velocidad de producción específica, así como una menor cantidad de ARNm codificante en el citoplasma (Novasep, 2009), pero también se reporta la aparición y proliferación durante el cultivo de clones no productores o poco productores, los cuales, si poseen velocidades específicas de crecimiento superiores a la población productora, terminan constituyendo mayoritaria, es decir, lo que ocurre es un reordenamiento de la representatividad de las sub-poblaciones celulares presentes en el cultivo (Soloizabal, 2010).

Fernández en el 2019 revela en sus estudios que los componentes que presentan mayor influencia en el medio de cultivo desde el punto de vista estequiométrico son los aminoácidos ya que afectan la concentración de las células vivas al variar los límites y que las células no son sensibles a cambios en la concentración de nutrientes como las vitaminas, lípidos y otros componentes, esto no significa que estos componentes del medios de cultivo, no cumplen un papel fundamental en el ambiente celular.

Salazar y col. en el 2016, plantearon que los aminoácidos son usados para el crecimiento y el mantenimiento de las células, también reportaron que son los más consumidos debido a que el producto final de su descomposición es acetil-CoA, que es el precursor directo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. También Pereira y col. en el 2018 publicaron que las células emplean estos para resistir funciones celulares, como crecimiento celular, y utilizados para la construcción de los bloques para las síntesis de las proteínas.

Todo esto explica la efectividad de la composición óptima de los nutrientes que conforman el medio basal DMEM/F-12 donde la concentración de aminoácidos supera el doble del RPMI 1640 empleado en la cinética como se observa en ficha comerciales confeccionadas por los proveedores de cada medio empleado, por este hecho se obtienen los resultados satisfactorios en crecimiento celular, productividad corroborada con la potencia e avidez, resultados que como ya mencionamos superan en general a los otros medios empleados en cinética y también en otros estudios cinético como los de Casado en el 2015.

Como conclusión previa determinamos que el medio cultivo con los mejores resultados en la actividad biología fue el DMEM/F-12 + 8% SFB del 5to y 7mo día llegando a una potencia máxima de 4096 y una avidez de 5 s y 4 s con una intensidad de 3+ y 4+ respectivamente en los dos fenotipos sanguíneos B y AB, valores correspondientes a una concentración de células vivas de 1.18×10^6 cel/mL y una viabilidad de 73.3 % parámetros que servirían para estrategias de producción posteriores y mostrando el cumplimiento de los requisitos de calidad.

Los otros medios de cultivo como RPMI 1640 +8% SFB que a pesar de que cumplió con requisitos de calidad sus valores de potencia estuvieron muy cercanos a los límites, como también el PFHM-II que reporto valores muy bajos de potencia y cumplimiento de la avidez muy cercano al límite mínimo de 30s, evidenciando todo esto que no cumple con los requisitos de calidad en general.

La composición diferente de los medios de cultivo influye en el comportamiento del hibridoma en el proceso de crecimiento y producción, por lo que, buscando a modo de valorar la complejidad de los mismos en cuanto a su composición, se evaluara la presencia de algunos nutrientes presentes en el medio de cultivo, así también, como presencia de IgM en el sobrenadante, que

corrobre la productividad de anticuerpo. Para ello se empleó la técnica de Separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), como se describe en el **Acápito 3.5.1. de Materiales y Métodos**.

4.5. Perfiles de los medios de cultivos y sobrenadantes ensayados en cromatografía de exclusión por HPLC.

4.5.1. Caracterización cromatográfica del medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 8% de SFB y sobrenadante anti-B obtenido.

La **Figura 24(A)** muestra el cromatograma del medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 8% de SFB en el cual se observan 6 picos con el valor absorbancia y Tr en minutos para cada pico. Se puede distinguir en el cromatograma que el medio contiene varios componentes, algunos de concentración relativa apreciable y que responden a longitudes de onda de 280 nm, resultando el pico de mayor presencia de sus componentes el pico III. Así se demuestra que el medio DEMEM/F12 tiene una estructura compleja y rica en nutrientes, como se describe en la bibliografía (**Anexo 11.**).

El DMEM como medio basal no contiene proteínas o agentes que promuevan el crecimiento, aunque se suplementa con suero fetal bovino, en este caso. Este medio tiene alta concentración de aminoácidos, con presencia de glutamina, y de vitaminas; así como nitrato férrico, piruvato de sodio y glucosa, lo que lo hace apropiado para el cultivo de una gran variedad de células. Este se enriquece con las mezclas de nutrientes de Ham, que incorpora minerales, sales orgánicas, ácidos grasos, precursores de ácidos nucleicos y como tampón hepes, conteniendo o no, indicador rojo fenol (**Anexo 12.**).

En la **Fig. 24(B)** se muestra el cromatograma del sobrenadante anti-B obtenido a partir del cultivo del hibridoma anti-B en el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8% de SFB, después del cultivo del Hibridoma, en la cual se observan los mismos 6 picos, pero con una reducción en todas sus áreas (absorbancias) y por tanto en sus concentraciones, siendo más notable para el Pico II. Los primeros componentes que eluyen en el Cromatograma de la **Fig. 24(B)**, coinciden sus Tr con referencias con moléculas de referencias como la IgM, IgG y albúmina bovina, respectivamente; resueltas en otros trabajos bajo condiciones cromatográficas similares (*Salgado, 2018*). La columna utilizada TSKgel serie G3000SW^{XL} permite separar de manera eficiente moléculas desde 1000-10 kDa, cuyos datos se refieren en los sitios web de la firma TOSOHTM (*Tosoh, 2019*).

En el primer pico de Abs 0.033 y Tr 5,28 min se separa la IgM (*Salgado, 2018*), el cual tiene un ligero incremento de su absorbancia. Como se puede observar en ambos cromatogramas, del medio de cultivo y sobrenadante, está presente este pico, que podría sugerir la presencia de compuestos de tamaño molecular alrededor de 900 kDa, como las hormonas añadidas o componentes proteicos que se añaden a este medio de cultivo con el F12 o el SFB. También se evidencia una corrida del pico de resolución de 5.34 - 5.28 min; lo que podría sugerir en el medio de cultivo (**A**) la presencia de proteínas como la fibronectina (PM 440 kDa) componente importante del SFB y factor clave para la adhesión celular. En el sobrenadante anti-B (**B**) se observa un incremento del área de este pico podría adjudicarse a la producción de la IgM.

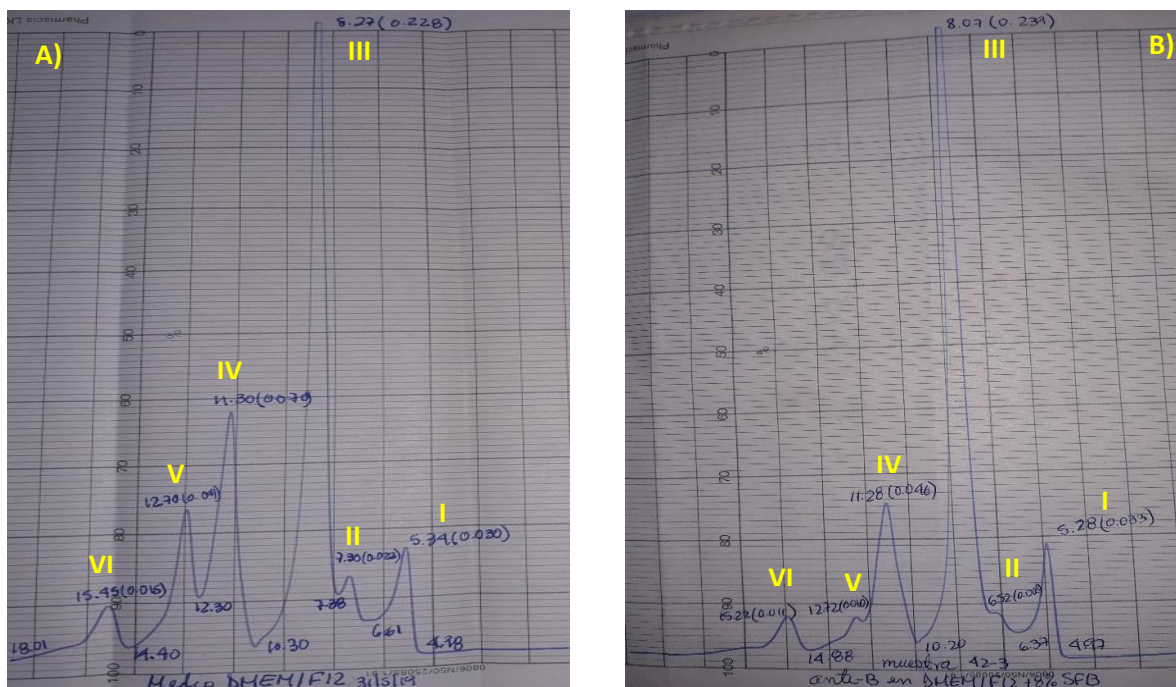


Figura 24. Cromatogramas de la corrida en HPLC de las muestras de medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 8% de SFB (A) y el sobrenadante anti-B obtenido (B).

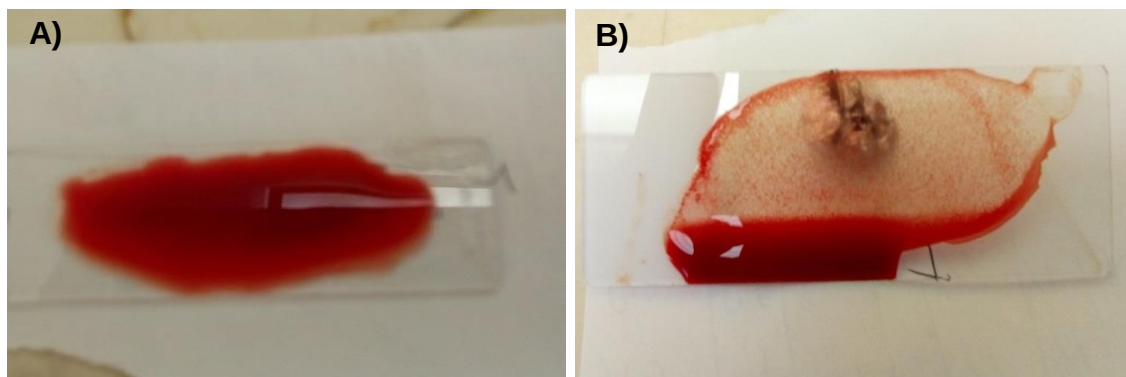


Figura 25. Prueba de hemaglutinación en lámina del medio de cultivo DMEM/F12 (A) negativa y del sobrenadante anti-B (B) positiva.

Para corroborar si hay presencia del AcM isotipo IgM en este pico, que reconoce el antígeno B, se realizó una prueba de hemaglutinación en lámina con sangre B y AB (**Fig. 25**), según el Procedimiento de Calidad A5 PNO.001 (LABEX, 2019 A5 PNO.001). El resultado de esta prueba fue: para el eluato del medio de cultivo DMEM/F12 + 8% de SFB es negativo y para el eluato del sobrenadante positivo en fenotipo B, avidez de 4 s con una intensidad de 4+ y positivo en fenotipo AB, la avidez fue de 6s con una intensidad de 4+. Por lo que se confirma la producción de IgM y su elución en el primer pico.

La IgM es una proteína multimerica de PM 950 kDa, por lo que eluye en Tr 5.2-5.4 min (*Salgado, 2018*), en dependencia de la disociación de sus monómeros por efecto de la presión. Es sorprendente que en el medio sin cultivar aparecen componentes que tienen pesos moleculares similares a la IgM, lo que se visualiza en el cromatograma mostrado en la **Fig. 24(A)**. No obstante, se comprueba que aparece la IgM en el sobrenadante anti-B como resultado del cultivo del hibridoma anti-B en DMEM/F12 suplementado con 8% SFB, correspondiendo al incremento que se observa de este pico (**Fig. 24(B)**).

Presumiendo los restantes componentes, en alusión a los que se han descrito en bibliografía del medio DMEM/F12, el pico que se identifica en Tr 7.29 min, debe tener PM mayores que la IgG (PM 150-160 kDa). El perfil cromatográfico característico del anticuerpo anti-CD45 producido en LABEX perteneciente al isotipo IgG, es a Tr - 7,7 min (*G. Rabel, 2014, Salgado, 2018*). El pico resuelto en las muestras de DMEM/F12 eluye a valores de Tr menores adjudicándole un mayor tamaño, pero cercano; lo que podría ser el ácido ascórbico que se describe su presencia en DMEM y su PM es 176 kDa, lo que justificaría el corrimiento (176 kDa vs 150 kDa, 7.29 min vs 7.7 min). Este pico, es el que en mayor proporción se reduce su área del cromatograma en el medio de cultivo, no siendo detectable.

El medio fue suplementado con SFB, donde el componente mayoritario es albúmina sérica, el cual en las mismas condiciones de corrida y comparado con BSA, se identifica a Tr 8.2-8.7 min para un PM de 67 kDa, según su procedencia (*Salgado, 2018*). Este es un pico predominante en ambas muestras, en medio de cultivo y sobrenadante, que podría englobar a las albuminas séricas que están en el rango de los 60 kDa, pero también al ácido pirúvico (88 kDa) y la transferrina, polipéptido de 70-95 kDa que también han sido descritos en el mismo; de ahí sus valores significativos de concentración (**Fig. 24**).

También disminuyen sus concentraciones (áreas) los picos de Tr 11.3, 12.8, 15.4 min, deduciendo que estos últimos son componentes de PM menores a 60 kDa que participan como sillares estructurales como aminoácidos, vitaminas y azúcares, que son proveídos en la formulación del medio (**Anexo 11**).

4.5.2. Caracterización cromatográfica del medio RPMI-1640 suplementado con 8% de SFB y el sobrenadante anti-B obtenido.

Aunque se describe el RPMI-1640 como un medio complejo, sus componentes suelen ser mayoritariamente moléculas pequeñas, fácilmente metabolizables, precursores metabólicos; conteniendo una gran cantidad de fosfatos, vitaminas y aminoácidos e intermediarios del ciclo de

Krebs (**Anexo 13**). Son medios diseñados para facilitar la purificación posterior del sobrenadante y mayoritariamente son medios químicamente definidos; además requiere control del pH en cultivo por cuanto su pH es alrededor de 8, por lo que puede adicionársele rojo fenol como indicador (Hagrot, 2011).

Lo dicho anteriormente se corrobora al observar el cromatograma del medio RPMI suplementado con 8% de SFB, pues en la **Fig. 26(A)** se observa un solo pico de Abs de 0.130 y Tr 8.38 min; el cual, por lo anteriormente expuesto se corresponde con los componentes del SFB, pues este no contiene proteínas en su fórmula basal (Salgado, 2018; Altamirano y col., 2014). La corrida cromatográfica está determinada para registrar hasta Tr de 20 min, aunque la columna TSK gel SW_{XL} utilizada para separar proteínas y péptidos grandes permite separar moléculas desde 0,5-5000 kDa (Tosoh, 2019).

En el suero fetal bovino se reconoce la presencia de albúmina y transferrina, cuyos pesos moleculares se reconocen de 60 a 95 kDa; cuyas funciones son necesarias para estimular crecimiento, para eliminar citotóxicas y promover la adhesión celular, entre otras funciones importantes.

En la **Fig. 26(B)** del cromatograma del sobrenadante anti-B, donde aparecen varios picos resultantes de la actividad metabólica de la línea celular y a su vez, reducción de componentes mayoritarios metabolizados como es el caso del SFB, que evidencia una significativa reducción de su área y, por tanto, su concentración: absorbancia de 0.130 a 0.029. El primer pico se presume pertenece a la IgM con un valor de Abs de 0.084 y Tr de 5.22 min. Esto se corrobora con la prueba de aglutinación directa (LABEX, 2019 A5 PNO.001), cuyos resultados se muestran en **Fig. 27**.

Los picos a Tr 11.28 y Tr 12.73 min, son los que incrementan durante el cultivo, pudiendo ser intermediarios metabólicos peptídicos de pequeño PM o compuestos orgánicos que absorben la longitud de onda de trabajo, ya mencionado anteriormente. En un gráfico de resolución de columnas TSKgel G3000SW_{XL}, la BSA (67 kDa) eluye aproximadamente a los 8 min; mientras que se resuelven a Tr de 11 a 12 min, patrones como ribonucleasa A (12,6 kDa), citocromo C (12,4 kDa) y tetrámeros de Gly 0.25 (kDa) (Tosoh, 2019).

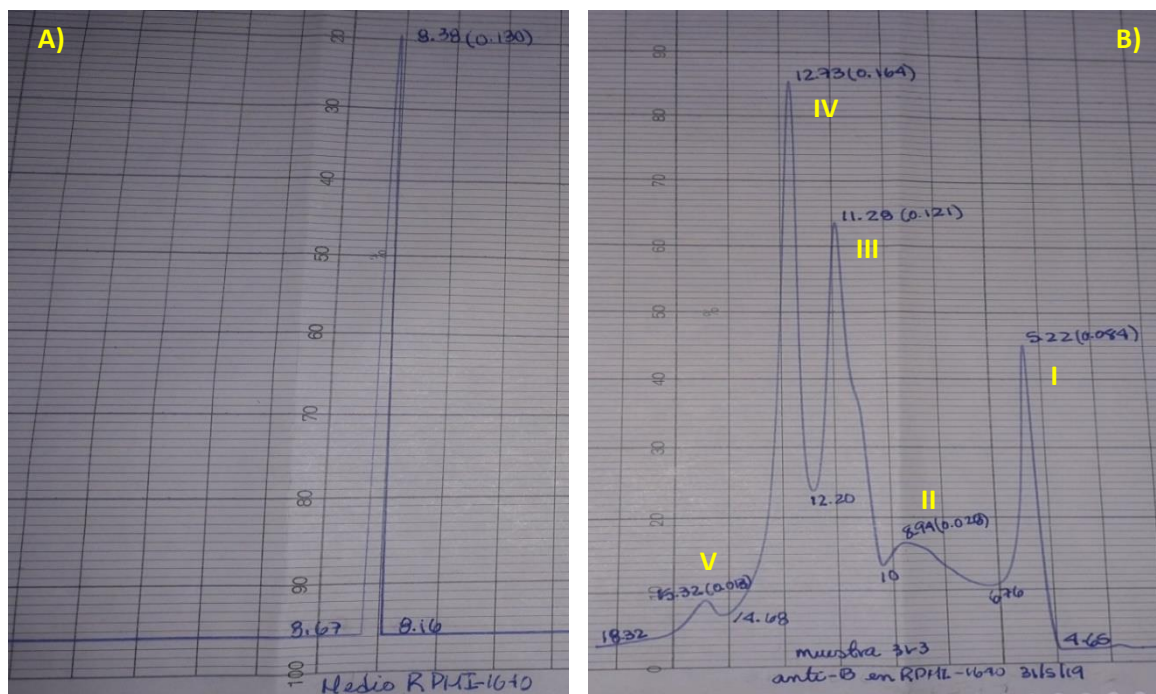


Figura 26. Cromatograma de la corrida en HPLC de las muestras del medio de cultivo RPMI-1640 + 8% SFB (A) y sobrenadante anti-B obtenido (B).

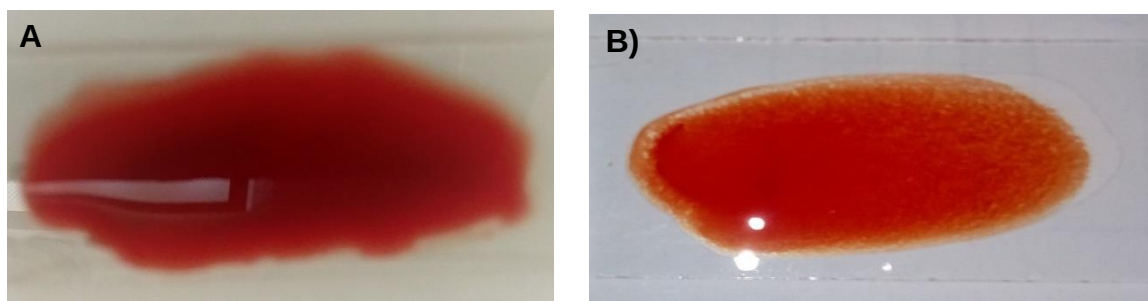


Figura 27. Prueba de hemaglutinación en lámina del medio de cultivo RPMI 1640 (A) negativa y del sobrenadante anti-B (B) positiva.

4.5.3. Caracterización cromatográfica del medio PFHM II y del sobrenadante anti-B obtenido.

El PFHM II es un medio sin componentes de origen animal, sin suero, sin proteínas, diseñado específicamente para soportar el crecimiento de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales y la composición es patente de su proveedor (www.biocompare.com).

En la **Fig. 28(A)** se muestra el cromatograma del medio de cultivo PFHM-II en el cual se observan 4 picos mayoritarios. El primer pico a Tr 8.30 min tiene una Abs de 0.033; el segundo pico con Tr 11.37 min y una Abs de 0.122; el tercer pico tiene una Abs de 0.196 y Tr 12.77 min; el cuarto y último pico tiene una Abs de 0.013 y Tr de 15.64 min. Como se observa, existe una gama de compuestos diversos en PM que barren desde los 1000 kDa a 60 kDa, no estando presente la BSA por cuanto este medio no se suplementa con SFB; sugiriendo también que los componentes mayoritarios añadidos son de PM < 60 kDa como son aminoácidos, vitaminas, precursores de ácidos nucleicos, etc.

En la **Fig. 28(B)** se muestra el cromatograma del sobrenadante anti-B. El primer pico pertenece a la IgM con un valor de Abs 0.094 y Tr 5.20 min, siendo similar su absorbancia que en medio RPMI 1640. En el cromatograma también se observa que luego del primer pico de Abs aparecen cuatro que se corresponden con los observados en el cromatograma del medio de cultivo. Se observa una reducción del pico uno del medio de cultivo que se identifica a Tr de 9.80 min y se puede deducir de esta observación que acá la célula consume de este nutriente. Ocurre algo similar con los restantes picos, en los cuales se observa el consumo de los nutrientes correspondientes a los picos del medio de cultivo, se puede ver como disminuye la absorbancia de estos picos en el cromatograma del sobrenadante.

La **Fig. 29** muestran las pruebas de hemoaglutinación en láminas realizadas al medio PFHM-II y al sobrenadante obtenido del cultivo celular en este medio (LABEX, 2019 A5 PNO.001). Como se observa, en la lámina no hubo reacción de aglutinación y sólo se detecta reacción anti-B, para isotipo IgM, en el sobrenadante de cultivo.

Haciendo un resumen de lo contrastado en los cromatogramas de los medios de cultivo DMEM/F12, RPMI-1640 y PFHM-II, se observa que el medio más complejo es DMEM/F12 con al menos 6 de picos resueltos y suplementación con SFB; correspondiéndose con los mejores resultados de crecimiento. El cromatograma del sobrenadante obtenido del medio RPMI-1640 muestra que el pico identificado como IgM a Tr 5.22 min con una absorbancia de 0.084, mientras que el sobrenadante del DMEM/F12 se identifica a Tr 5.28 min con 0.033 de absorbancia y el cromatograma del medio PFHM-II muestra, aunque no es suplementado con SFB exhibe 4 picos con variados PMs (**Fig. 28**), identificando la IgM a Tr 5.20 min con 0.094 de absorbancia.

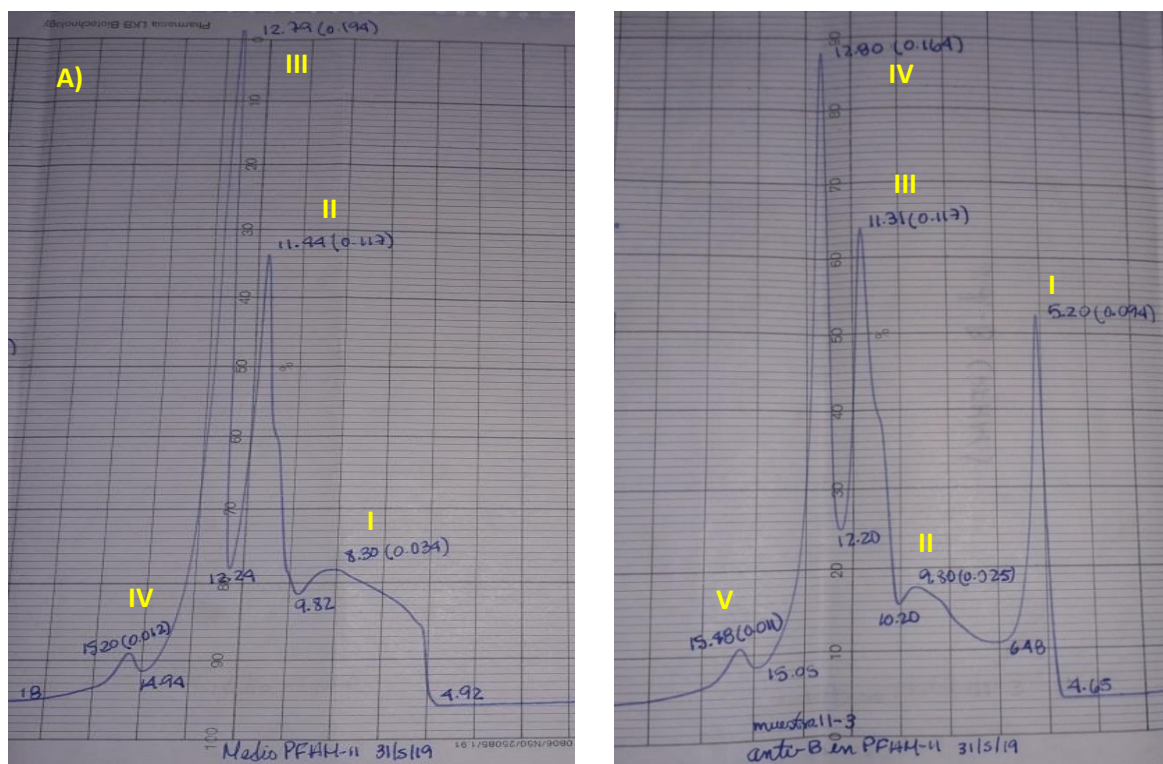


Figura 28. Cromatograma del medio de cultivo PFHM-II (A) y del sobrenadante anti-B obtenido del cultivo del Clon BSM-4 (B) en este medio de cultivo.

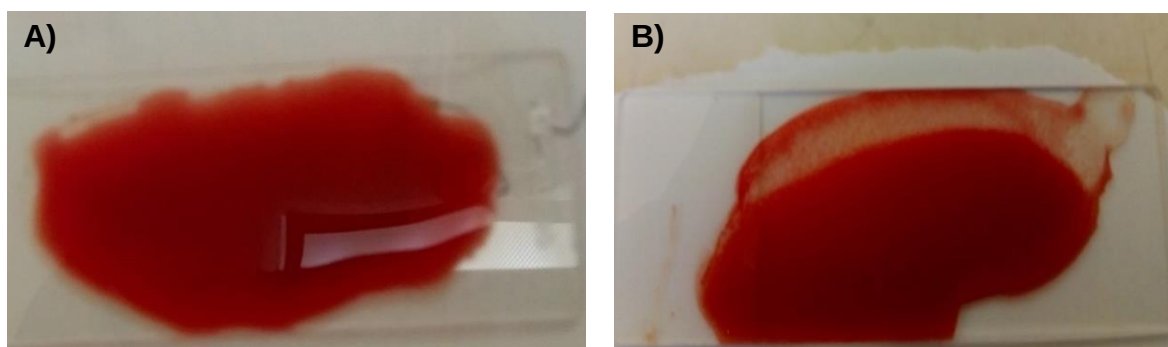


Figura 29. Prueba de hemoaglutinación en lámina para detección de IgM anti-B: negativa en medio PFHM-II (A) y positiva para el sobrenadante del cultivo (B).

4.6. Resultado de la actividad biológica del sobrenadante colectado del cultivo del hibridoma en las mezclas de medios de cultivo.

Encontrar un buen medio de cultivo celular es muy importante para el desarrollo general del cultivo celular. El desafío de hoy es desarrollar medios sofisticados que puedan ser optimizados individualmente para una gama de cultivos. La diversidad de líneas celulares y el hecho de que haya tantos componentes en los medios lo hacen muy complicado. El hecho de que muchos de esos componentes son interdependientes y la complejidad de las vías del metabolismo celular le agregan otra dificultad a este desafío (Sahin y col., 2009).

El uso de los medios de cultivo mezclados es una alternativa que se viene desarrollando y que ha traído muy buenos resultados en el cultivo de células en la industria biofarmacéutica. Un ejemplo es el medio de cultivo DMEM/F-12 desarrollado por la compañía Invitrogen, este es una mezcla 1:1 entre DMEM y el F-12 de Ham. Es un medio extremadamente rico y complejo, utilizado para propiciar el crecimiento de una amplia gama de tipos celulares y estudiar sus características biológicas (Sahin y col., 2009).

Otro ejemplo más actual son los dos medios libres de proteínas en forma de mezcla que se utilizan en el CIM para la producción de la eritropoyetina humana recombinante y también otro es la mezcla de medio de cultivo empleada en la producción del anticuerpo monoclonal (AcM) Racotumomab de origen murino, obtenido a partir del hibridoma 1E10/2H6, a los cuales una vez preparados se someten a controles de calidad establecidos que garanticen que el medio está apto para ser usado.

En las **Figs. 30 y 31**, se muestran los valores de actividad biológica en los fenotipos sanguíneos B y AB, se midió la potencia y avidéz del sobrenadante anti-B obtenido del cultivo del hibridoma en las mezclas de medios de cultivo al 3er y al 6to día.

Al 3er día (**Fig. 30**) se observa que el sobrenadante anti-B obtenido de la mezcla de medio de cultivo D+C (DMEM/F-12+Cell Boost 5) tuvo el mejor resultado en cuanto potencia y avidéz, en sangre B el sobrenadante marcó una potencia de 512 y una intensidad de 1+ y una avidéz de 7 s con una intensidad de 1+, en sangre AB marcó una potencia de 256 con una intensidad de 1+ y una avidéz de 8 s con una intensidad de 1+, el sobrenadante obtenido de la mezcla de medio de cultivo D+P (DMEM/F-12+PFHM-II) en sangre B y AB llegó a una potencia de 256 con una intensidad de 1+ y una avidéz de 12 s con una intensidad de 1+, el obtenido de la mezcla de medio cultivo D+P+C (DMEM/F-12+PFHM-II+Cell Boost 5) en sangre B y AB llegó a una potencia de 128 con una intensidad de 1+ y una avidéz de 16s con una intensidad de 1+, el sobrenadante obtenido de las otras mezclas de medio de cultivo como P+S (PFHM-II+8% SFB) y P+C (PFHM-II+Cell Boost 5) no marcó potencia ni avidéz, en general ninguna de las muestras obtenidas en este día cumplieron con los estándares o requisitos de calidad de potencia y avidéz.

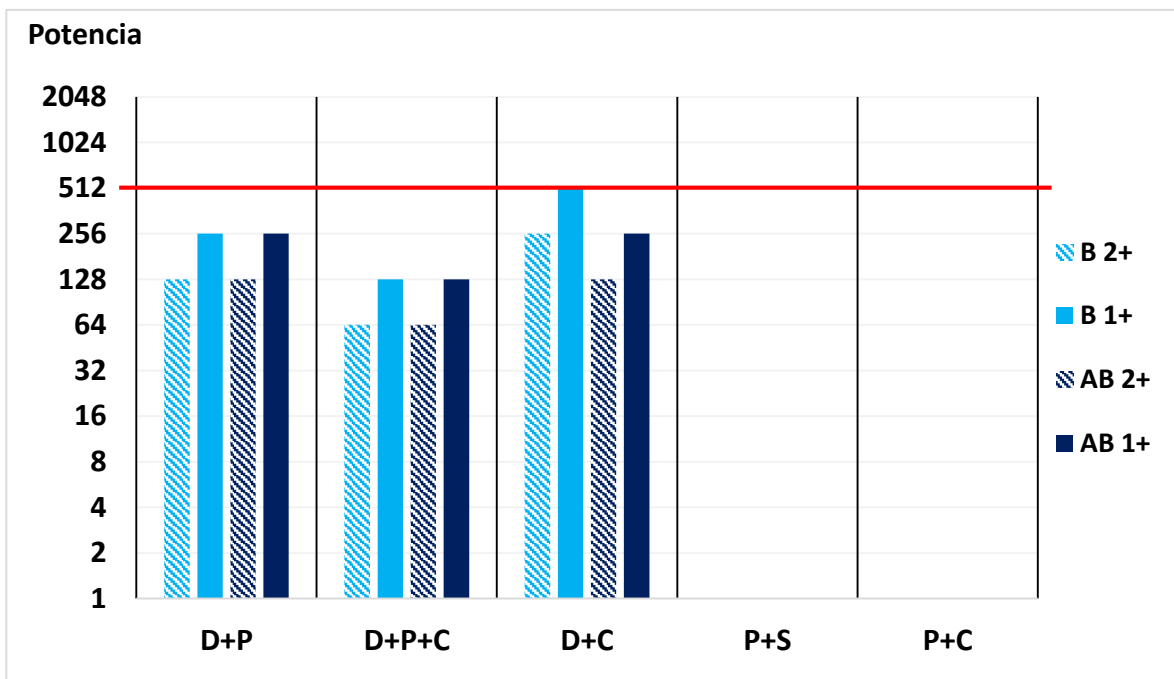


Figura 30. Resultado de la actividad biológica de los sobrenadantes anti-B obtenidos en el 3er día cultivo del hibridoma en las diferentes mezclas de medio de cultivo.

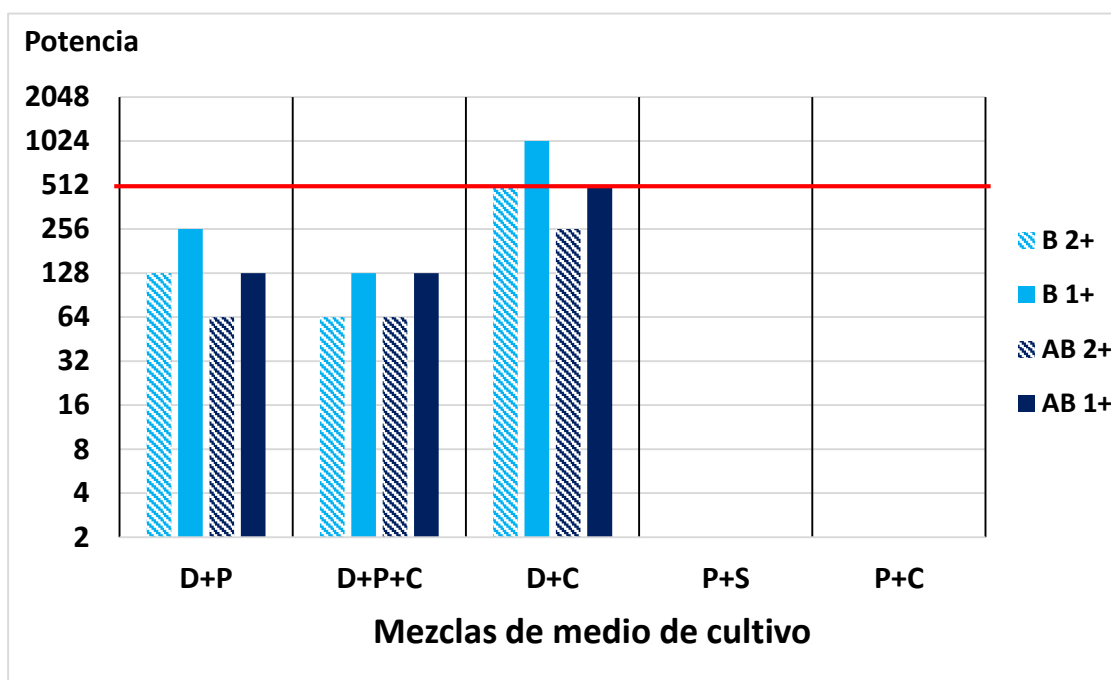


Figura 31. Resultado de la actividad biológica de los sobrenadantes anti-B obtenidos en el 6to día cultivo del hibridoma en las diferentes mezclas de medio de cultivo.

Al 6to día (**Fig. 31**) el sobrenadante anti-B obtenido de la mezcla D+C aumento sus valores de potencia y avidéz, en sangre B marcó 1024 de potencia con una intensidad de 1+ y una avidéz de 5 s con una intensidad de 1+, en sangre AB la potencia marcó 512 con una intensidad de 1+ y una avidéz de 7 s con una intensidad de 1+, el obtenido de la mezcla de medio de cultivo D+P en sangre B marcó 256 de potencia con una intensidad de 1+ y una avidéz de 12 s con una intensidad de 1+, en sangre AB llegó a 128 de potencia con una intensidad de 1+ y una avidéz de 12 s con una intensidad de 1+ y el sobrenadante obtenido de las otras mezclas de medio de cultivo restantes dieron resultados similares al del 3er día, hecho bastante alarmante señalando al medio de cultivo PFHM-II suplementado con SFB precisamente porque contiene suero fetal bovino suplemento que comúnmente es utilizado en la obtención del sobrenadante anti-B que se pudiera explicar por inestabilidad de la línea celular de hibridoma.

Existen muchos estudios en la literatura que han informado inestabilidades en la expresión de proteínas en líneas celulares, entre ellas están las líneas de hibridomas (*Boggiano, 2004*) que con más frecuencia presentan problemas de inestabilidad en la producción de anticuerpos, debido a muchos casos al hecho de que su origen es la fusión de dos células. Las causas de la inestabilidad de la expresión son varias y en muchos casos el mecanismo molecular exacto es desconocido (*Barnes, 2001*).

Se ha demostrado que la inestabilidad es altamente frecuente, y en algunos casos transitoria (*Bae y col., 1995; Merritt y Palsson, 1993; Lee y col. 1991*). Estas alteraciones pueden ser de origen genético, como mutaciones, la inserción, supresión o pérdida del cromosoma causada por los reordenamientos genéticos y que también pudieran ser inducidas por la variación de las condiciones ambientales, variables críticas tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto (DO) o limitaciones de nutrientes. Estas alteraciones pueden conducir a la aparición de células hibridomas con diferentes características, tales como, pérdida de la capacidad para la producción de anticuerpos, la formación de variantes de la cadena pesada, la formación de variantes de idiotipo o la producción incompleta de cadenas pesadas o ligeras (*Coco-Martin, 1992*). Barnes también informa que las poblaciones no productoras aparecen debido a alteraciones genéticas relacionadas con la síntesis del anticuerpo a niveles de transcripción (mutaciones, pérdida de genes, codificación de la proteína), traducción y secreción de la proteína (*Barnes, 2003*).

De un modo concluyente los sobrenadantes anti-B obtenidos de las mezclas de medio de cultivo formuladas con el medio basal DMEM/F-12 resultaron con potencia y avidéz bastante considerable, resaltando la mezcla D+C, no así los sobrenadantes obtenidos de los medios de cultivo PFHM-II suplementados con SFB y Cell Boost 5, los cuales no dieron resultados satisfactorios

En el trabajo realizado por Casado en 2017 usando PFHM-II suplementado con insulina y glutamina se notó también una baja potencia de aglutinación con respecto al RPMI-1640 suplementado con 8 % de SFB que marcó 1024, con PFHM-II suplementado con insulina y glutamina la potencia marcó solo hasta 256 en fenotipo B y 128 en AB que tampoco se cumplió con requisitos de calidad.

4.7. Propuestas de procesos productivos para la obtención del sobrenadante anti-B.

La propuesta del proceso productivo del sobrenadante anti-B es uno de los objetivos más importantes de este trabajo, basándonos en los resultados obtenidos en la caracterización cinética desarrollada por el hibridoma anti-B en los medios de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8% de SFB, RPMI 1640 suplementado con 8% SFB y PFHM-II, resultando como el mejor desempeño el DMEM/F-12 suplementado con 8% SFB superando a las otras propuestas de medios de cultivo sin obviar que el medio RPMI 1640 suplementado con 8% de SFB junto al DMEM/F-12 cumplieron con los requisitos calidad de actividad biológica establecidos por sistema de calidad de Labex.

Por otro lado, se realizó un ensayo donde se cultivó el hibridoma anti-B en el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con Cell Boost 5 buscando otras propuestas, en el que se midió la actividad biológica del sobrenadante obtenido logrando valores de potencia, avidéz e intensidad bajos con respecto al DMEM/F-12 suplementado con 8% de SFB y prácticamente similares a los resultados obtenidos en el medio de cultivo RPMI 1640, pero éstos cumplieron con los requisitos de calidad de actividad biológica establecidos, a partir de estos resultados se propone utilizar tres propuestas de medios de cultivo para la obtención del sobrenadante anti-B, DMEM/F-12 suplementado con 8% SFB, suplementado con Cell Boost 5, en las cuales el sobrenadante obtenido cumplen con los requisitos de calidad implantados por sistema de calidad de Labex y son variantes nuevas de medios cultivos en el que hibridoma se desarrolla perfectas condiciones y pueden sustituir al medio de cultivo RPMI 1640, que comúnmente se utiliza en la producción del sobrenadante anti-B, sin obviar al medio de cultivo RPMI 1640.

Estas propuestas se realizarán a partir de la fermentación *in vitro* en frascos rotatorios perteneciente a la tecnología desechable, tecnología que también es utilizada en la obtención de los sobrenadantes anti-D y anti-D débil Du ingredientes con los que formula el reactivo Hemoclasificador anti-D. Los problemas más críticos que actualmente restringen su uso surgen de la limitada experiencia en la industria e insuficiente resistencia del material plástico a las condiciones de operación, además la renovación del contenedor desechable en cada fermentación conduce a un aumento del consumo de materiales y de los residuales sólidos (Rao y Brorson, 2009; Eibl y Eibl, 2008).

Las propuestas de los procesos productivos del Hemoclasificador anti-B se hicieron en base a 30000 frascos de 5 mL para un volumen de 5,5 mL por frasco, demanda anual promedio, para los cuales se requerirán 165 L de sobrenadante anti-B.

4.7.1. Propuesta de producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios en RPMI 1640 suplementado con SFB.

En el LABEX en años anteriores se producía el Hemoclasificador anti-B de *forma in vivo*, o sea, por el método de producción de líquido ascítico extraído de ratones de la línea *Balb/c* a partir de una inoculación previa (Esparraguera, 2006; Soria, 2010). Este es ampliamente utilizado en la industria biotecnológica con fines investigativos y de diagnóstico, que por lo general requieren de

pocos volúmenes de producto, una de sus principales desventajas, y una gran concentración de AcMs, una de sus principales ventajas (*Flickinger y Drew, 1999*). Por el aumento progresivo de la demanda y por el uso excesivo de animales con fines productivos conlleva a que se buscara la alternativa de aumentar los volúmenes de producción empleando la fermentación *in vitro* en frascos rotatorios.

Se comenzó estableciendo el proceso de producción del Hemoclasificador anti-D como prioridad, empleando el modo de operación semicontinuo en el medio de cultivo RPMI suplementado con 8% de SFB, con la desventaja de que el proceso tiene operaciones que resultan intensivas y la extremada manipulación de gran cantidad de frascos en fermentación, y la falta de control de pH y Oxígeno disuelto, variables muy importantes para mantener un control riguroso del proceso productivo (*Abijana, 2011*).

El proceso de producción de sobrenadante anti-B empleando el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 8% SFB se propone realizarlo en modo discontinuo utilizando 16 posiciones de frascos rotatorios; proceso productivo similar al expuesto por Casado en 2017 pero utilizando otro modo de operación semicontinuo (**Anexo 14**).

Se comenzaría con la etapa de preparación del medio de cultivo, en este caso el RPMI1640 suplementado con 8% de SFB, después se pasa a la etapa de descongelación y después a la expansión celular del hibridoma, se descongela un ámpula de hibridoma anti-B en frascos de cultivo de 25 cm² a una concentración de 0.3×10^6 cel/mL y después se expande a medida que las células aumenten su confluencia a frascos de cultivo de mayores capacidades con el fin de alcanzar la cantidad de células adecuada por frascos para posteriormente comenzar la etapa de producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios. (**Tabla 12**)

La etapa de producción sobrenadante anti-B en frascos rotatorios comenzaría con el sembrado de los frascos rotatorios a una concentración celular de 0.3×10^6 cel/mL en un volumen de trabajo de 500 mL, por lo que se necesita 150×10^6 cel. Las cosechas se realizarán basándose en la caracterización cinética del hibridoma en este medio de cultivo para garantizar que la potencia del sobrenadante alcance un valor igual o superior a 512, cumpliendo con los estándares de calidad, en este caso se propone realizar la cosecha a los 7 días de cultivo, pero a los 7 días de cultivo no es posible tener una viabilidad del cultivo que te permita volver a obtener otra cosecha del mismo, teniendo en cuenta la curva de caracterización cinética (**Fig. 17, Epígrafe 4.3**). Por lo que debemos tener una reserva en cultivo en frascos de 175 cm² para expandir el hibridoma hasta tener una cantidad de células que permita sembrar en frascos rotatorios para volver hacer la misma operación para obtener las cosechas. Los lotes de sobrenadante anti-B serán conformados con un volumen aproximadamente de 8000 mL. El proceso de producción se observa en el esquema del **Anexo 14**.

Tabla 12. Indicadores de la propuesta de producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios en RPMI 1640 suplementado con SFB y DMEM/F-12 suplementado con Cell Boost 5.

Volumen de SN anti-B (L) - IFA	165
Dilución en la formulación	1:1
Volumen de SN anti-B a producir y para formulación (L)	165
Cantidad SN x frasco (mL)	500
Volumen de SN x lote (L)	8
Lotes x demanda	21
Tiempo de producción de la demanda (165 L) (d)	454

4.7.2. Propuesta de producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios en DMEM/F-12 suplementado con Cell Boost 5.

La propuesta de producción de sobrenadante anti-B empleando el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con Cell Boost 5 se propone realizar idénticamente como se plantea el proceso de producción con el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB.

4.7.3. Propuesta de producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios en DMEM/F-12 suplementado con SFB.

El proceso de producción de sobrenadante anti-B empleando el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8% SFB se propone realizar en el modo semicontinuo también utilizando las 16 posiciones de frascos rotatorios, igualmente se comienza por la etapa de preparación del medio de cultivo y se realizan todas actividades similarmente hasta la etapa de expansión celular. La etapa de producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios también comenzaría con el sembrado de los frascos rotarios a una concentración celular de 0.3×10^6 cel/mL en un volumen de trabajo de 500 mL. Las cosechas se realizarán basándose en la caracterización cinética del hibridoma en este medio de cultivo, serán efectuadas a las 120h equivalente a 5 días, garantizando que el sobrenadante marque una potencia de 4096 y el cultivo tenga una viabilidad por encima de 70%, como se puede observar en el gráfico de la caracterización cinética del hibridoma en este medio de cultivo (**Fig. 18, Epígrafe 4.3**). En esta variante de producción después de cada cosecha como el cultivo queda a una viabilidad por encima de 70% se ajusta a una concentración a 0.3×10^6 cel/mL añadiendo medio fresco y mediante algunos pases en cultivo se logra aumentar la viabilidad para proceder a realizar las cosechas. Los lotes de sobrenadante anti-B también serán conformados con un volumen aproximado de 8000 mL. El proceso de producción se observa en el esquema del **Anexo 15. (Tabla 13)**

De un modo comparativo y de conclusión entre las tres propuestas la propuesta productiva de sobrenadante anti-B empleando DMEM/F-12 suplementado con SFB es la más atractiva de acuerdo con el gasto de tiempo de la producción de la demanda completa en un período de 70 días y con la ventaja de que el sobrenadante anti-B se cosecha con una potencia de 4096 y es diluido hasta 4 veces su volumen, así de esta manera se reduce el volumen de la demanda que es de 165 L de sobrenadante anti-B a producir y formular a 41.25 L, no así para las otras dos propuestas con un período de 252 días en producción para cumplir la demanda y en este caso el sobrenadante no es diluido por lo que el volumen a producir sería 165 L.

El trabajo realizado por Casado en el 2017 uno de los procesos productivos para obtener el sobrenadante anti-B se basó en la utilización de los frascos rotatorios empleando el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB en modo semicontinuo, realizando cosechas cada 72 h, para garantizar una potencia por encima de 512 y una viabilidad celular superior a un 85%, éste al ser muy parecido al presentado en este trabajo es poco llamativo frente al proceso productivo utilizando DMEM/F-12 suplementado con SFB atendiendo también a la potencia con que obtiene el sobrenadante que es muy superior al de Casado que se obtuvo en 512 y el tiempo de cumplimiento con la demanda es pequeño con respecto al de Casado ventaja que es provechosa en un futuro pudiéndose aumentar la demanda nacional y cubrir demandas internacionales, por lo que generaría un aumento en los ingresos.

4.8. Análisis económico de las propuestas productivas

El análisis económico de este trabajo es un aspecto importante que se orientó a analizar gastos directos de las etapas en los procesos productivos propuestos, así como la ventaja que representa la sustitución de un medio de cultivo.

El análisis económico se realizó a partir de las fichas de costo del producto, la cual se confeccionó mediante las fichas técnicas por cada una de las etapas de la producción del Hemoclasificador anti-B (Obtención de Sobrenadante anti-B que se divide en dos subprocesos, preparación de medio de cultivo y producción de sobrenadante anti-B, y Producto Terminado tiene tres subprocesos, formulación, etiquetado y llenado) calculando los gastos directos de cada etapa o subetapa del proceso de producción en base a la demanda anual de este producto, **30000 frascos**, y se determinó el costo total de producción y la ganancia de cada una de las propuestas de producción (**Anexo 16; 17; 18**).

Primeramente, se comienza el análisis económico por la propuesta productiva que normalmente se emplea en Labex para producir el Hemoclasificador anti-B, o sea, empleando el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 8% SFB en frascos rotatorios, pero esta vez en modo discontinuo, la cual arrojó un costo total de producción de **132240.60 UM/a** representando el **11%** de la ganancia de **773939.40 UM/a** como se observa en la **Fig. 35**. En la **Fig. 32** se observa una representación gastos directos y el porcentaje que representa cada una de las etapas y sub-etapas de la producción del costo total, comenzando con la etapa de obtención de sobrenadante anti-B conformada por la preparación de medio de cultivo con un gasto directo de **16011.96 UM/a** representando un **12%** de costo total, la producción de sobrenadante anti-B reportó un gasto de **65167.04 UM/a** representando del costo total un **49%** y la etapa de producto terminado con un gasto de **51061.61 UM/a** representando un **39%** del costo total de producción.

La propuesta productiva empleando el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8% SFB en frascos rotatorios en modo semicontinuo viene resultando una de las más atrayente en el desarrollo de este trabajo, su costo total de producción resulto de **61525.78 UM/a** representando el **7%** de la ganancia de **844654.22 UM/a** como se observa en la **Fig. 35**. En la **Fig. 33** se observa la conformación de los gastos directos y el porcentaje que representa cada etapa y sub-etapa del costo total de producción. La etapa de obtención de sobrenadante anti-B compuesta por la preparación de medio de cultivo con un gasto de **3845.67 UM/a** presentando un **6%** del costo total, la producción de sobrenadante con un gasto de **6613.98 UM/a** presentando **11%** del costo total y la etapa de producto terminado con un gasto de **51066.12 UM/a** representando un **83%** del costo total de producción.

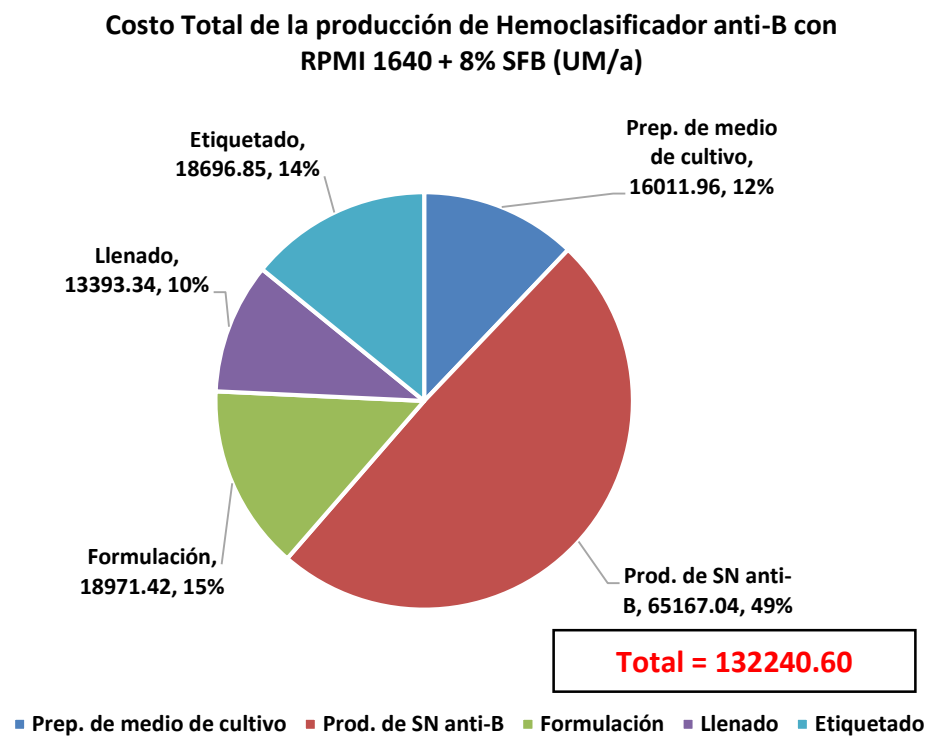


Figura 32. Estructura del costo total de producción de las etapas de producción del Hemoclasificador anti-B empleando el medio de cultivo RPMI 1640-F1 suplementado con 8% SFB.

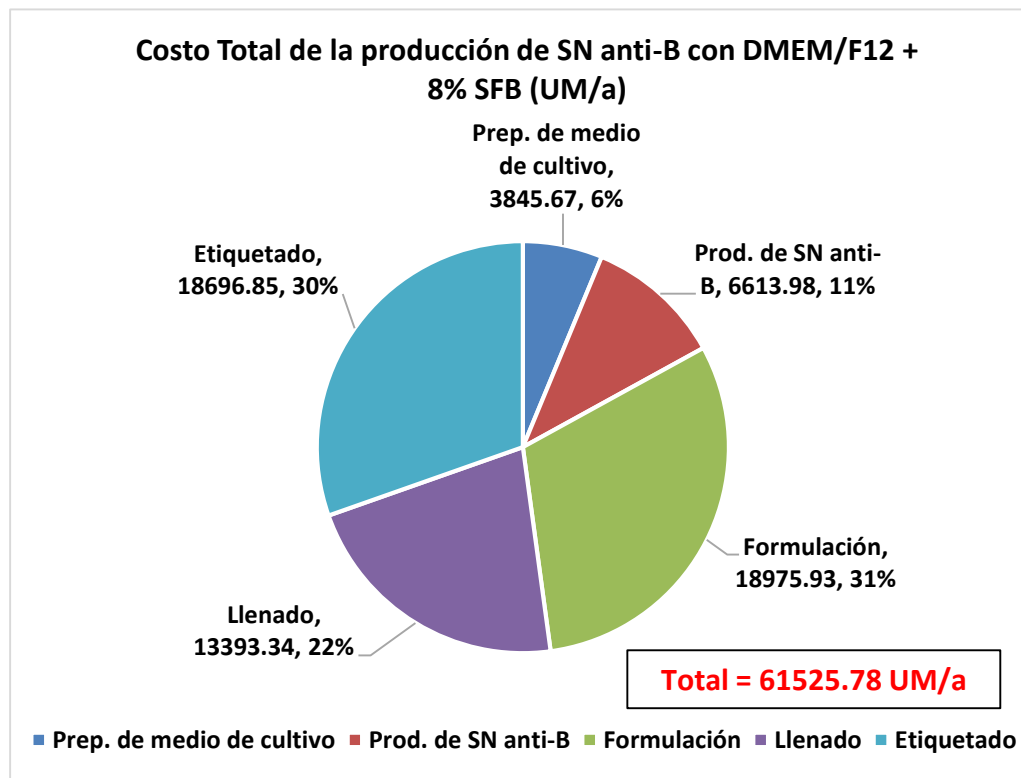


Figura 33. Estructura del costo total de producción de las etapas de producción del Hemoclasificador anti-B empleando el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8% SFB.

La siguiente propuesta productiva también empleando el medio de cultivo DMEM/F-12 pero suplementado con Cell Boost 5 que también se utilizarían los frascos rotarios en modo discontinuo, es una variante muy diferente a las anteriores con respecto al suplemento usado, que en cuanto a costo es un poco más barato que el SFB oscilando su precio alrededor de 200 USD. Esta propuesta productiva resulto con un costo total de producción de **128184.07 UM/a** representado el **16%** de la ganancia de **777995.93 UM/a** como se observa en la **Fig. 35**, también se representan en la **Fig. 34** los gastos directos y el porcentaje representativo de cada etapa y sub-etapa con respecto al costo total. La sub-etapa de obtención de sobrenadante anti-B, preparación de medio de cultivo resulto con un gasto de directo de **11955.42 UM/a** representando un **9%** del costo total, el gasto directo de la producción de sobrenadante anti-B es de **65167.04 UM/a** representando un **51%** de costo total y la etapa de producto terminado arrojo un gasto directo de **51061.61 UM/a** representando el **40%** del costo total de producción.

De una manera comparativa de las tres propuestas productivas, la propuesta productiva de sobrenadante anti-B utilizando el medio de cultivo DMEM/F-12 con 8% SFB es la alternativa más viable económicamente de acuerdo con el análisis económico, determinando que se obtiene la mayor ganancia (**844654.22 UM/a**) y por supuesto el menor costo de producción en esta propuesta productiva como se observa en la **Fig. 35** y por tener la ventaja de obtener un sobrenadante con una potencia de 4096 junto a una aidez de 4 s con una intensidad de 3+ parámetros de actividad biológica superiores a los parámetros del sobrenadante anti-B obtenido en las otras propuestas productivas, de acuerdo con esto, se llega al cumplimiento de la demanda anual de **30000 frascos** de Hemoclasificador anti-B en un tiempo de **45 días** mientras que las otras propuestas necesitan más de un año para poder cumplir con la demanda por lo que se necesitaría aumentar el volumen de sobrenadante obtenido por lote con la recomendación del empleo de equipos de fermentación a escala piloto o industrial que generaría un aumento de los gastos directos e indirectos, así como el costo de producción total. Esta ventaja también ayuda a disminuir drásticamente los gastos de las sub-etapas de Obtención de sobrenadante como se puede apreciar en la **Fig. 33**, en la que la sub-etapa de preparación de medio de cultivo tiene costo de **3845,67 UM/a** y la producción de sobrenadante tiene costo de **6613,98 UM/a** mientras que el costo de estas sub-etapas en las otras propuestas productivas excede los **10000 UM/a**, además también es disminuida la repetida manipulación de los frascos rotatorios en cultivo en la etapa de obtención de sobrenadante que afecta la asepsia del proceso productivo y constituye un riesgo de proceso, y que se utilizaría menor cantidad de reactivos, aditivos y materiales que se utilizan en sub-etapas, lo que como habíamos mencionado se disminuiría los gastos y así el costo en la etapa productiva del proceso.

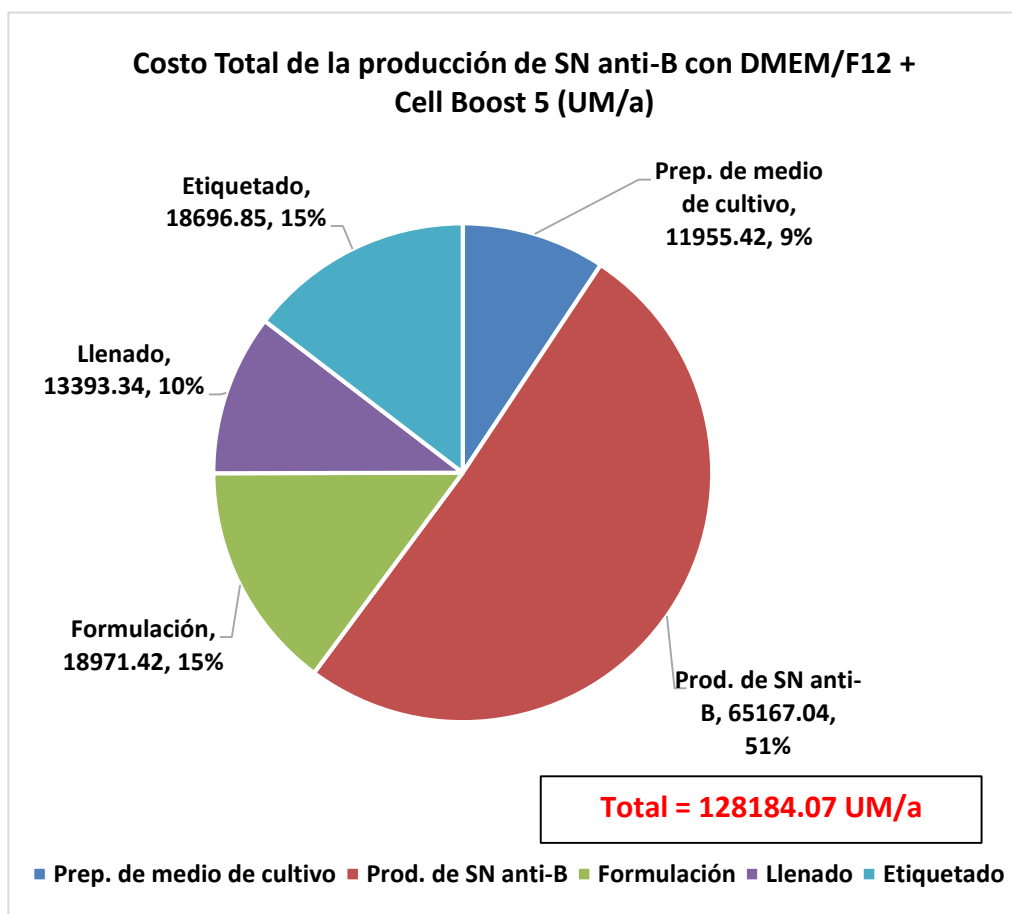


Figura 34. Estructura del costo total de producción de las etapas de producción del Hemoclasificador anti-B empleando el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con Cell Boost 5.

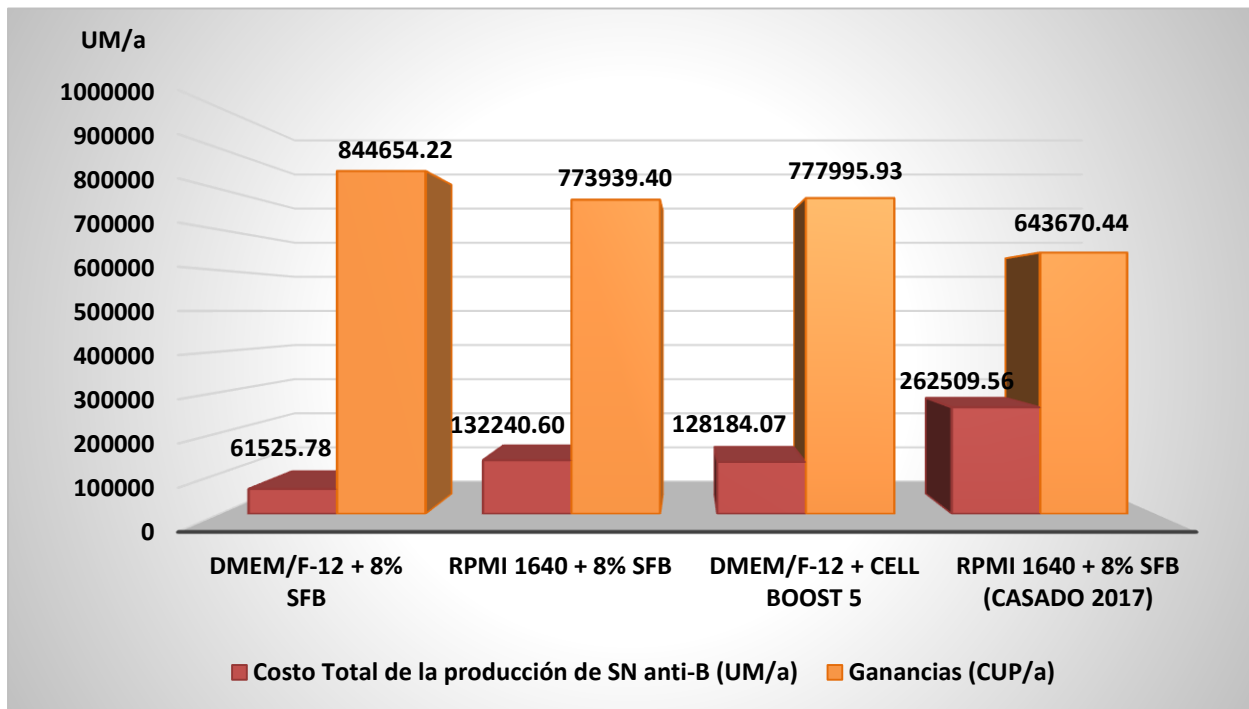


Figura 35. Costo de producción y Ganancia de las propuestas de producción comparados con los estimados por Casado en 2017.

Casado en 2017 en un trabajo investigativo realizó el análisis económico de varias propuestas productivas para obtener sobrenadante anti-B empleando el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 8% SFB y así producir el Hemoclasificador anti-B, en donde la propuesta productiva de sobrenadante anti-B en frascos rotarios fue la que mayor ganancia reportó, que ésta muestra un valor de ganancia inferior comparada con la propuesta productiva analizada, que en este trabajo arrojó la mayor ganancia, en este caso es la que utiliza como medio de cultivo el DMEM/F-12 suplementado con 8% SFB para producir el sobrenadante anti-B, esto se puede observar en la **Fig. 35**. Este resultado explica también que la propuesta productiva de sobrenadante anti-B también presenta disímiles ventajas sobre la propuesta productiva planteada por Casado en 2017 entre las que están la potencia de aglutinación del sobrenadante obtenido que es 4096 para la propuesta productiva que utiliza DMEM/F-12 y 512 para la propuesta planteada por Casado, el tiempo de cumplimiento de la demanda de sobrenadante anual para la propuesta productiva que utiliza DMEM/F-12 es de 45 días mientras que para Casado fue de 150 días y también, como se planteó anteriormente es disminuida la repetida manipulación de los frascos rotatorios en cultivo en la etapa de obtención de sobrenadante que afecta la asepsia del proceso productivo y constituye un riesgo de proceso, y por último se disminuirían los gastos y así el costo en la etapa productiva del proceso.

Conclusiones

5. Conclusiones

1. Se realizó el análisis de la información en el que se eligieron cuatro medios de cultivo a suplementar y 3 suplementos de la plataforma del CIM, según la característica del hibridoma y su disponibilidad: DMEM/F-12, PFHM-II, IMDM y MyeloCIM como medios basales; Cell Boost, Suero Fetal Bovino e Insulina como suplementos.
2. El proceso de adaptación celular del hibridoma anti-B en los medios de cultivos teniendo en cuenta las plataformas elegidas se realizó empleando el método directo para el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8% de SFB y el método secuencial para los medios de cultivo PFHM-II y MyeloCIM, obteniéndose los mejores resultados en el DMEM/F-12 suplementado con 8% de SFB arrojando valores de concentración de células vivas promedio 1.27×10^6 cel/mL, la velocidad específica máxima promedio 0.030 h^{-1} y el tiempo del proceso de adaptación de 27 días.
3. La caracterización cinética del hibridoma anti-B en el medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 8% de SFB tuvo el mejor desarrollo comparado con los medios de cultivo RPMI 1640 suplementado con 8% y PFHM-II reportando valores de concentración de células vivas máxima de 2.1×10^6 cel/mL alcanzada a las 72 h.
4. El sobrenadante anti-B obtenido de la caracterización cinética del hibridoma en DMEM/F-12 suplementado con 8% de SFB evidencio el cumplimiento de los requisitos de calidad o liberación establecidos por Sistema de Gestión de Calidad de LABEX, reportando una potencia de 4096, una avidéz de 4 s e intensidad de 3+ en los dos fenotipos sanguíneos B y AB, este también comparado con el sobrenadante obtenido de los otros medios de cultivo ensayados.
5. En la caracterización cromatográfica de exclusión por HPLC determinó que el medio basal DMEM/F-12 con 6 picos es más complejo que los medios basales RPMI 1640 y PFHM-II y que en los tres casos la elusión Tr 5.2-5.4 min identifica que el hibridoma anti-B secreta una inmunoglobulina IgM con PM 950 kDa.
6. La propuesta productiva empleando DMEM/F-12 suplementado con 8% SFB resulto la más viable económicamente en comparación con las propuestas productivas empleando RPMI 1640 y DMEM/F-12 suplementado con Cell Boost 5, con un costo total de producción de **61525.78 UM/a**, una ganancia de **844654.22 UM/a** y un volumen de producción total de sobrenadante anti-B para formulación de **41.25 L** diluido hasta 4 veces para cumplir la demanda anual de **30 000 frascos (165 L)** en un tiempo de **45 días** al año.

Recomendaciones

6. Recomendaciones

1. Probar las plataformas de medios de cultivo, así como suplementos propuestos que no se utilizaron para la obtención de sobrenadante anti-B a partir del Hibridoma anti-B clon BMS-4.
2. Realizar un análisis de metabolitos para determinar los nutrientes críticos en los medios de cultivo de la caracterización cinética.
3. Proponer un proceso de fermentación a escala piloto con las variantes de medios de cultivo propuesto en este trabajo y realizar un análisis económico del mismo.

Bibliografía

7. Bibliografía

Abijana G. 2011. "Obtención de un reactivo monoclonal anti-D in vitro". Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.

Altamirano C, Berrios J, Vergara M.; 2014 "Efecto diferencial de la temperatura de cultivo y la tasa de crecimiento específica sobre el comportamiento de las células CHO en cultivo de quimiostato". Centro Nacional de Información Biotecnológica, EEUU.

Arathoon W.; Birch J. 1985 "Large scale cell culture in biotechnology". Science.; 232. 1390-1395.

Arora M. 2013. "Medios de cultivo celular: una revisión". Mater Methods, 3: p 175.

Arrieta O.; Sotelo J.; 2005 "Growth factors in brain tumors: A therapeutic target". Disponible en: <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>. Consultado el 10 de diciembre 2019

Avgerinos G, Drapeau D, Socolow J y col., 1998, "Spin filter perfusion system for haigh density cell culture: production of recombinant urinary type plasminogen activator in CHO cells", Biotechnology, 8: 54-57.

Ávila S. 2015. "Establecimiento de un proceso productivo in vitro para la obtención de un reactivo hemoclasificador anti-D". Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.

Bae, S. W., Hong, H. J., Lee, G. M. 1995. "Stability of transfectomas producing chimeric antibody against the pre-S2 surface antigen of hepatitis B virus during a longterm culture". Biotechnol. Bioeng. 47: 243-251.

Barnes L., Bentley C., Dickson A., 2001. "Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system". Biotechnol Bioeng. May 20; 73(4):261-70.

Barnes L., Bentley C., Dickson A. 2003. "Stability of Protein Production From Recombinant Mammalian Cells". Biotechnology and Bioengineering, vol. 81, no. 6, march 20.

Barrios Y. SM.; Acosta S. D.; González F. H.; Hayes R. G. 2014 "Optimización del medio de cultivo QBP para la producción de biomasa del consorcio BIOYAF". Revista Colombiana de Biotecnología 16(1):171-176. Colombia.

Biblioteca del Complejo Hospitalario Universitario 2006 "Juan Canalejo" de A Coruña. Normas de Vancouver. Enero.

Biowest, 2016 "Peace of mind begins with Free Add". Disponible en https://www.biowest.net/media/biowestfreeaddflyer__077502000_1438_14032019.pdf

Boggiano T. 2004. "Estabilidad de los clones secretores de R3h, recuperación de la capacidad productiva". Tesis de Maestría en Ciencias biotecnológicas, IFAL. Habana. Cuba.

Boggiano, T.; Sánchez K.; et al. 2015. "Acetato de sodio: una alternativa para la optimización de la producción ed transfectomas NS0". *Bioprocesos*, Vol. 1, No. 1, marzo.

Brewer J.; Randall T.; Parkhouse R.; Corley, R. 1994. "Mechanism and subcellular localization of secretory IgM polymer assembly". *The Journal of Biological Chemistry*, 269:17339-17348.

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G. 2010. "Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database". *ALTEX*, 27: 53-63.

Butler M. 2005. "Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(3):283-291.

Butler M. 2015. "Serum and Protein Free Media". En: *Animal Cell Culture*. M. AlRubeai (ed.). Ed. Springer, Switzerland, Vol.9: 223-234.

Casado L.; 2017. "Propuesta de un proceso productivo para la obtención de un reactivo hemoclasificador anti-B". Tesis de Maestría. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

Castillo M. S., 2015 "Propuesta de un medio de cultivo suplementado con acetato de sodio para la producción del anticuerpo Racotumomab". Tesis de grado. Universidad de la Habana. CUJAE. Facultad de Ingeniería Química. Centro de Inmunología Molecular. La Habana. Cuba.

Chico E.; Rodríguez G.; Figueredo A.; 2007. "Bioreactors for Animal Cell". In: Castilho L.R, Moraes A.M, Augusto EFP. and Butler M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. Francys and Taylor. UK.

CECMED. 2011. "Regulación No. 59-2011". Requisitos De Los Diagnosticadores Utilizados En Inmunoematología. Disponible en: <https://www.cecmec.cu/>. Consultado el 25 de noviembre de 2019.

CECMED; 2017. "Registro Sanitario de Diagnosticadores Certificado". La Habana. Cuba.

Coco-Martin J. M., Oberink J. W., Brunink F., Van der Velden-de Groot T. A. M., Beuvery E C. 1992. "Instability of a hybridoma cell line in a homogeneous continuous perfusión culture system". *Hybridoma* 11:653–665.

Coppo; Baez. 2010. "Grupos sanguíneos". Disponible en: <http://www.bioapuntos.cl/apuntos/grupos.htm>. Consultado el 7 de junio de 2020.

Cruz H.; Moreira J.; Stacey G.; 1998 "Adaptation of BHK cells producing a recombinant protein to serum-free media and protein-free medium". *Cytotechnology*. 26: 59-64.

Cultek. Cultivos celulares. Disponible en: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007. Consultado el 9 de mayo de 2020.

Da Silva E., 2017 "Evaluación de suplementos nutricionales en cultivo de células CHO recombinantes en suspensión". Rio de Janeiro. Brasil

Didier C.; Etcheverrigaray M.; Kratje R.; 2008 “Optimización de la Producción de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) mediante el cultivo de células animales”. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Dowd J, Jubb A, Ezra K, Piret J, 2003, “Optimization and control of perfusion cultures using a viable cell probe and cell specific perfusion rates”, *Cytotechnology*, 42: 35-45.

Dreyer A., Coello N., Montiel E., 2000. “Utilización de la metodología de superficie de respuesta de la optimización de un medio de cultivo para la producción de L-lisina por *Corynebacterium glutamicum*”. *Agronomía Tropical*. 50: 167-188.

Eibl R., Eibl D. 2008. “Bioreactors for mammalian cells: general overview. En: *Cell and tissue reaction engineering*”. R. Eibl, D. Eibl, R. Pörtner, G. Catapano y P. Czermak (ed.). Ed. Springer, Heidelberg: 55–82.

Esparraguera Y.; 2006. “Obtención de un reactivo hemoclasificador con el hibridoma anti A IHI-15 en biomodelos murinos Ofbalb (F1) y Balb/c”. Tesis de Maestría. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba

Eto N.; Yamada K.; Shito T.; Shirahata S.; Murakami H.; 1991. “Development of a Protein-free Medium with Ferric Citrate Substituting Transferrin for the Cultivation of Mouse-Mouse Hybridomas”. *Agricultural and Biological Chemistry*. 55:3, 863-865, DOI: 10.1080/00021369.10870670

Expert Committee on Biological Standardization. 2006. “International Standards for Minimum Potency of Anti-A and Anti-B Blood Grouping Reagent”. *Annual Report by World Health Organization (WHO)*, Switzerland.

Faife E., Rodríguez T., Rabaza Y., Badía T., Victores S., Castillo A., 2008. “Effects of selection and adaptation of NS0 cells to protein-free medium on the properties, affinity and biological activity of a monoclonal antibody”. *Biotechnología Aplicada*; vol. 25 (3), 247-253.

Fernández A. F., 2019 “Evaluación de un medio de cultivo en la producción de EPOhr en células CHO”. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana. CUJAE. Facultad de Ingeniería Química. Centro de Inmunología Molecular. La Habana. Cuba.

Figueredo A.; 2002 “Evaluación de la tecnología de perfusión en biorreactores de tanque agitado como alternativa productiva para la obtención del anticuerpo hR3”; Tesis de Maestría en Ciencias Biotecnológicas; ISPJAECIM; Cuba.

Galván A.; 2013. “Selección de un medio de cultivo alternativo para la producción del anticuerpo monoclonal Nimotuzumab”. Tesis de grado, Universidad de La Habana, La Habana. Cuba.

Galván A., Valdés R., González M., Aragón H., Hernández D., Padilla S., Gómez L., Gailán D., Villegas Y., Tamayo A., Pérez A., Pérez B., Lao M., Calvo Y., Fernández A., Lee L., Suárez J., García J., Ojito E. 2016. “Long-term CB. Hep-1 Monoclonal antibody production in a single-use bioreactor on a Rocker Platform with Serum- and Protein Free Media”. *BioProcessing Journal*, Winter 2015/2016.

García J.; 2004 “Elementos de microbiología”. Post-grado. Maestría en procesos Biotecnológicos.; CIGB-CUJAE. C. Habana. Cuba.

García A. 2011. “Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. Neurología”, 26 (5): 301-306.

Gener D. J.F.; Miranda A. A.; Vitón B. P.; 2010; “Propuesta de un proceso productivo para el anticuerpo monoclonal ior-T4 usando fermentadores desechables”. Tesis de Grado, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

General Electric Healthcare 2016. Disponible en: <http://www.gelifesciences.com>. Consultado el 3 de marzo de 2020.

Gómez F. R. A.; Tamez G. R. S.; Tamez G. P.; Rodríguez P. C. 2008 “Impacto de la biotecnología en la inmunología”. Medicina Universitaria (México); 10 (39): 92-101.

Grispan S. 1983. “Grupos Sanguíneos ABO Y Rh”. Rev. Medica Honduras, 51:103-114.

Gutierrez H.; de la Vara R. 2008. “Análisis y diseño de experimentos”. México DF: McGraw-Hill Interamericana.

Hagrot E.; 2011 “Desarrollo de un sistema de cultivo para modelar el efecto del pH en células CHO”. Tesis de Maestría. KTH School of Biotechnology. Estocolmo, Suiza.

Harrison R. G., Greenman M. J., Mall F. P., Jackson C. M.; 1907 “Observations of the living developing nerve fiber”. Anat Rec.; 1:116–128.

Hayter P., Kirkby N., Spier R., 1992. “Relation between hybridoma growth and monoclonal antibody production”. Enzyme Microb. Technol., 14: 454-461.

Horn M.; Zuercher A.; Imboden M.; Rudolf M.; Lazar H.; Wu, H. 2010. “Preclinical in vitro and in vivo characterization of the fully human monoclonal IgM antibody KBPA101 specific for *Pseudomonas aeruginosa* serotype IATS-O11”. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54: 2338-2344.

Hernández A.; 2014. “Establecimiento del proceso de fermentación para el anticuerpo monoclonal anti-CD45”. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana. La Habana.

Hernández R., 2015. Tendencias principales en la manufactura biofarmacéutica: 2017. Pharmaceutical Technology, 13(4): 5-10.

Ilag L. 2011. “Immunoglobulin M as a vaccine adjuvant”. Medical Hypotheses, 77: 473-478.

Integra Biosciences AG. “CELLROLL y CELLSPIN”. Suiza. Disponible en: www.integra-biosciences.com. Consultado el 10 noviembre de 2019.

Invitrogen Corporations. 2001. “Hybridoma Cells”. Disponible en: www.invitrogen.com. Consultado el 3 de mayo de 2020.

Janatpour K.A.; Kalmin N.D.; Jensen H.M.; Holland P.V.; 2008, "Clinical outcomes of ABO-incompatible RBC transfusions". *Am J Clin Pathol*; 129: 276- 281.

Kiehl, T., D. Shen, y col., 2011. "Observations of Cell Size Dynamics Under Osmotic Stress". *Cytometry* 79: 10 p.

Kindt T. J.; Goldsby R. A.; Osborne B. A.; 2007. "Inmunología de Kuby". Sexta Edición. Mexico. Parte II p:74-301

Köhler, G., Milstein C. 1975. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of determined specificity". *Nature*; 256: 495-719

Kunitake R. y col. 1997. "Fully Automated Roller Bottle Handling System for Large Scale Culture of Mammalian Cells". *J. Biotechnol.* 52(3): 289– 294

LABEX 2016. ESP.5060 "Sobrenadante anti-B".

LABEX 2018. ESP.1279 "Anti-B".

LABEX 2019. ESP.1232 "Banco de trabajo anti-B".

LABEX 2019. ESP.1233 "Banco maestro anti-B".

LABEX 2019. ESP.1381 "Hibridoma anti-B".

LABEX 2019. A5 PNO.001 "Determinación de la actividad biológica de la materia prima y del reactivo hemoclasificador Anti -D".

Lee G. M., Varma A., Palsson B.O., 1991. "Application of population balance model to the loss of hybridoma antibody productivity". *Biotechnol Progr* 7:72–75.

Lee Y. K., Teoh A.-P, Yap P. K., 1997. "Regulation of glucose and glutamine uptake and the production of monoclonal antibody in hybridoma cultures". *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 429-435.

Leno M., Merten W., Hache J., 1992. "Kinetic Analysis of Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production in Semicontinuous Culture". *Biotechnology and Bioengineering*, 39: 596-606.

Li F., Natarajan V., Sheng A., Kiss R., Amanullah A. 2010 "Cell culture processes for monoclonal antibody production". *mAbs*.;2 (5):466-479.

LifeTechnologies. 2014. "Hybridoma-Serum Free Media (SFM)". Disponible en: www.lifetechnologies.com. Consultado el 10 de enero de 2020.

Machado N. P.; Téllez G. A.; Castaño J. C.; 2006 "Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas". Artículo de revisión. Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia. Grupo de Inmunología Molecular. Centro de Investigaciones Biomédicas. Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 10(3): 186-197

Mader A.; Chromikova V.; Kunert R.; 2013. "Recombinant IgM expression in mammalian cells: A target protein challenging biotechnological production". *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4: 38-43.

Maddox I., Richert S. 1977. "Use of response surface methodology for the optimization of microbiological media". *J. Appl. Bacteriol.* 43: 197-204.

Mainwaring, D.; Wayte J. 2007. "Cell Culture Medium". Unit States, Lonza Biologics PLC. US 7258998 B2.

Maldonado J. 2016. "Experimentación con biomodelos animales en ciencias de la salud". *Avances en Biomedicina*, 5(3):1-10.

Malomgre W.; Neumeister B. "Recent and future trends in blood group typing". *Anal Bioanal Chem* 2009; 393: 1443-1451).

Marcus D. 1969. "The ABO and Lewis blood-group system immunochemistry, genetics and relation to human disease". *N Engl. J. Med.*, 280: 994-1006.

Martínez S.; 2005. Alternativa de cultivo incrementado para el aumento de rendimiento de biomasa en la fermentación de Estreptoquinasa. Tesis de Maestría. CUJAE. C. Habana. Cuba.

Mateo C.; Moreno E.; Amour K.; Lombardero J.; Harris W.; Pérez R.; 1997 "Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity". *Immunotechnology*. 3:71-81.

Meleady P., 1997. "Serum free cells growth and differentiation studies in cultured cell lines". Tesis de doctorado. Dublin City Universidad. Irlanda

Merritt S.E., Palsson B.O., 1993. "Loss of antibody productivity is highly reproducible in multiple hybridoma subclones". *Biotechnol Bioeng* 42: 247–250.

Milland J.; Sandrin M. 2006. "ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation". *Tissue Antigens*, 68: 459–466.

Miranda A. 2011. "Evaluación del Hibridoma t4 anti-CD4 para la producción in vitro del AcM ior-T4". Tesis de Maestría, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. Cuba.

National Research Council; 1999 "Monoclonal Antibody Production". s.l.: National Academy Press. Disponible en: <http://www.nap.edu/catalog/9450.html>. Consultado el 15 de diciembre de 2019.

Novasep, 2009. "AbSolute™ by Novasep: High Performance Protein A Media for the capture of monoclonal and polyclonal antibodies". s.l.: Novasep SAS.

Núñez C. Y.; Rodríguez C. L.; 2011 "Elaboración de la Ficha de Precio en la Empresa Materiales para la Construcción"; Trabajo Diploma, Universidad de las Tunas; Facultad de Ciencias Económicas.

Núñez S. 2014. “Estimación y Control de procesos biotecnológicos multivariables”. Tesis doctoral, Universidad de La Plata, Argentina.

Pereira S., Kildegaard H. F., Andersen M. R. 2018 “Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients”. Review. *Biotechnology Journal*;13.

Rabel, G.; 2014; “Obtención del anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína”. Tesis de Maestría. Universidad de Oriente-LABEX. Santiago de Cuba.

Rao G., Moreira A., Brorson K. 2009. “Disposable bioprocessing: the future has arrived. *Biotechnol.* *Bioeng.*, 102: 348–356.

Ringer S.; 1882 “Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle”. *J Physiol.*; 3:380–393.

Ringer S.; 1883 “A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart”. *J Physiol.*; 4:29–42.

Rivera A. G.E.,2016 “Selección de un medio de cultivo alternativo para la producción del anticuerpo monoclonal Racotumomab”. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana. CUJAE. Facultad de Ingeniería Química. Centro de Inmunología Molecular. La Habana.Cuba.

Sahin O., Frohlich H., Löbke C., Korf U., Burmester S., Majety M., 2009. “Modeling ERBB receptor-regulated G1/S transition to find novel targets for de novo trastuzumab resistance”. *BMC Syst Biol.*

Salazar A., Keusgen M., Hagen J. V. 2016 “Amino acids in the cultivation of mammalian cells”. *Amino Acids.*; 48:1161–71.

Salgado M.; 2018. “Propuesta de un procedimiento para mejorar la formulación del Hemoclasificador anti-D a partir de concentraciones de IgM”. Tesis de grado. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba

Santacruz L., Melo A., Rodriguez C.; Moscoso J. 2017. Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad. *Rev. Biociencias*, vol. 12 (2), julio-diciembre: 123-136.

Sapatnekar S. 2015. “Molecular Typing for Red Blood Cell Antigens”. American Association for Clinical Chemistry. Disponible en: <https://www.aacc.org/>. Consultado el 11 de julio de 2019.

Schröder M.; Matischak K.; 2004 “Serum and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11”. *J. Biotechnology.*; 108, 279-292.

Solozabal J., 2010. “Medición de la concentración de IgG2 de ratón por el método ELISA”. Procedimiento Normalizado de Operación del CIM; código PNO-5172.

Soria N.; 2010. "Obtención y evaluación del líquido ascítico murino hemoclasificador anti-B en las líneas de ratones Ofbalb (F1) y Balb/c". Tesis de Maestría. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.

Spalter S.; Kaveri S.; Bonnin E.; Mani J.; Cartron J.; Kazatchkine M. 1999. "Normal Human Serum Contains Natural Antibodies Reactive With Autologous ABO Blood Group Antigens". *Blood*, 93 (12): 4418-4424.

Stewart A. J.; Johnson M. D.; May F. E. B.; Westleyll B. R.; 1990. "Role of insulin-like growth factors and the type I insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells". *J. Biol. Chem.*, 265(34): 21172-21178.

Takeuchi H.; Kanzawa T.; Kondo Y.; Kondo S.; 2004 "Inhibition of platelet-derived growth factor signalling induces autophagy in malignant glioma cells". *Br J Cancer*. 90: 1069-1075.

Tavira C., Ortega A., Dávila I. Estrada S., Meneses A. 2009. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 40 (4), octubre-diciembre: 35-46

Teige M.; Weidemann R.; Kretzner G.; 1994 "Problems with serum-free production of antithrombin III regarding proteolytic activity and product quality". *Journal Biotech*. 34: 101-105.

Téllez G. 2017. "Obtención del Anticuerpo Monoclonal Anti-CD4 en Biorreactor de Olas Applikon 50L". Tesis de Maestría. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.

Tosoh BiosCiENCE; 2019. "Separation of Monoclonal Antibodies Using TSKgel HPLC Columns". Separation Report No. 74. Disponible en: <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/OpenPDF.aspx?path=/File%20Library/TBG/Products%20Download//Separation%20Report/sr12l74a.pdf>. Consultado el 7 de agosto de 2020.

Tosoh BiosCiENCE; 2019. "Separation of IgG and Albumin by High Performance Gel Filtration Chromatography Using TSKgel G3000SWXL (Application of IgG Preparation for Intravenous Injection)". Report No. 62. Disponible en: <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/OpenPDF.aspx?path=/File%20Library/TBG/Products%20Download//Separation%20Report/sr12l62a.pdf>. Consultado el 7 de agosto de 2020.

Tosoh BiosCiENCE; 2019. "TSKgel SWXL Series Columns". Report No. 46. Disponible en: <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/OpenPDF.aspx?path=/File%20Library/TBG/Products%20Download//Separation%20Report/sr12l46a.pdf>. Consultado el 7 de agosto de 2020.

Tosoh BiosCiENCE; 2019. Chromatography Catalog. Disponible en: <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/OpenPDF.aspx?path=/File%20Library/TBG/Products%20Download/Product%20Catalogs/c19l14a.pdf>. Consultado el 7 de agosto de 2020.

Vallez-Cheteanu F.; 2006, "Characterization of the mechanism of action of spin-filters for animal cells perfusion culture", Dr degree thesis, École polytechnique fédéral de Lausanne.

Vergara, M., S. Becerra y col., 2014. "Differential Effect of Culture Temperature and Specific Growth Rate on CHO Cell Behavior in Chemostat Culture". *Plos one* 9(4): 6.

Vicente Y. 2015. "Obtención de un clon estable de una línea celular hibridoma para la producción del AcM racotumomab". Tesis de Maestría, Universidad de la Habana, La Habana. Cuba.

Vitón P., Rodríguez T., Téllez G., Casado L., Soler A., Zorrilla H., Hernández A. 2015. "Comportamiento en cultivo de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales leucocitarios: Parte I. Estudios cinéticos a pequeña escala del hibridoma L3 productor del AcM α CD45". Bioprocesos, 1 (1):1-5.

Victores, Castillo, Faifer, Rabasa, Rodríguez, Rojas, Figueredo. 2008. "Cultivos semicontinuos como herramienta para la caracterización celular del hibridoma murino 1E10". Biotecnología Aplicada, 25: 149-154.

Vits H.; Hu W.; 1992 "Fluctuations in continuous mammalian cell bioreactor with retention". Biotechnol. Prog.; 8: 397-403.

Vollmers H.; Brändlein S. 2009. "Natural antibodies and cancer". New Biotechnology, 25: 294-298.

Wolfram W.; Sauerwein K.; Binder C.; Eibl-Musil N.; Wolf H.; Fischer M. 2016. "Pneumococcal Polysaccharide Vaccination elicits IgG anti-A/B Blood group antibodies in healthy individuals and Patients with Type I Diabetes Mellitus". Frontiers in Immunology, 7: 493.

Wittig O.; Alonso J.A.; Romano E.L.; Montaña R.F.; 2006. "Producción de anticuerpos monoclonales con especificidad por los grupos sanguíneos A y B". Evaluación de su uso como reactivos hemoclasificadores. Investigación Clínica, 47 (33): 253-264.

Yao T., Asayama Y.; 2017 "Medios de cultivo de animales y células: historia, características y problemas actuales". Wiley Reproductive Medicine and Biology; 1-3.

Yee D., Paik S., Lebovic G., Marcus R., Favoni R., Cullen K. 1989. "Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer". Mol. Endocrinol. Baltim. Md., 3 (3): 509-517.

Zhou W., Hu W. 1995. "Effect of insulin on a serum-free hybridoma culture. Biotechnology and Bioengineering", 47: 181-185.

Zorrilla Soto H.; Miranda A.; Viton Barrero P.; 2011; "Evaluación del Hibridoma Anti-B con miras a establecer un proceso productivo de un reactivo hemoclasificador por tecnología in vitro". Tesis de grado. Santiago de Cuba. Cuba. 1-36.

Otros Sitios Web Consultados:

<https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl097-8c.pdf>. Consultado 24 de abril de 2020.

<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>. Consultado el 18 de noviembre de 2019.

http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell_esp_bulahamf12.html. Consultado el 16 mayo del 2020.

<https://www.biocubafarma.cu/>. Consultado el 7 de noviembre de 2019.

<https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2017/12/13/120423.pdf>. Consultado el 19 de febrero de 2020.

https://www.ecured.cu/Centro_de_Inmunolog%C3%ADa_Molecular. Consultado el 25 de febrero de 2020.

https://www.3tres3.com/articulos/inmunidad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura_38562/. Consultado el 22 de julio de 2020.

<http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/20046/fichero/Anexo%252FANEXO+6.pdf>. Consultado el 14 de agosto de 2020.

www.laboratoriomicrovet.com. Consultado el 15 de junio de 2020

www.fishersci.com. Consultado el 4 de septiembre de 2019.

<https://www.thermofisher.com/es/es/home/technical-resources/media-formulation.60.html>. Consultado el 10 de enero de 2020.

<https://www.thermofisher.com/es/es/home/technical-resources/media-formulation.190.html>. Consultado el 10 de enero de 2020.

<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=17792>. Consultado el 10 de enero de 2020.

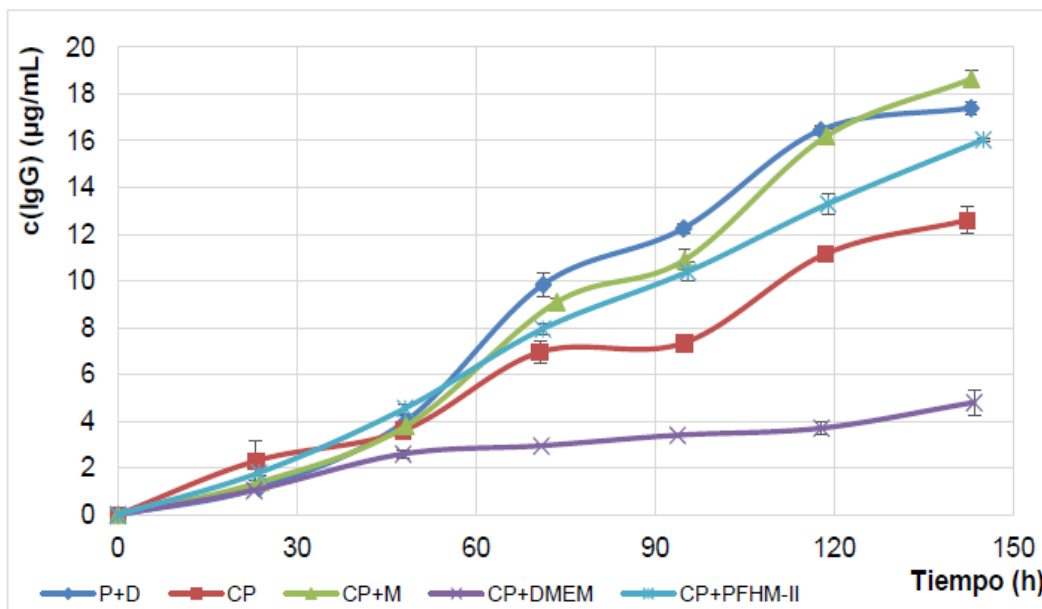
Anexos

8. Anexos

Anexo 1. Frascos de cultivo y Frascos rotatorios empleados en el cultivo de celular. (Tomado de Integra Biosciences AG. Disponible en: www.integra-biosciences.com). Consultado el 10 noviembre de 2019.



Anexo 2. Figura y Tabla de acumulación de AcM en las botellas rotatorias. Tomado de Castillo, 2015.



Medios de cultivo	$X_{v\text{máx}}$ (cél/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$\int X_v dt$ (cél/mL h)	IgG (μg/mL)	$q_{p\text{máx}}$ (μg/cél/h)	Prod. Vol. (mg/L/d)
P+D	3,25	0,034	2,88	17,4	$6,18 \times 10^{-8}$	2,92
CP+M	3,88	0,032	3,67	18,65	$4,97 \times 10^{-8}$	3,13
CP	2,51	0,021	2,36	12,6	$4,02 \times 10^{-8}$	2,12
CP+DMEM	2,6	0,034	1,84	4,8	$2,08 \times 10^{-8}$	0,8
CP+PFHM-II	3,19	0,029	2,86	16,05	$5,25 \times 10^{-8}$	2,66

Anexo 3. Parámetros cinéticos del Hibridoma anti-B en medio RPMI y en medio PFHM-II, en modo de fermentación por lote en frascos rotatorios. *Tomado de Casado, 2017.*

MEDIO DE CULTIVO	$X_{v\text{máx}}$ (10 ⁶ cel·mL ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	td (h)	Pot. máx	
				Fenotipo	
				B	AB
RPMI	1.18 ± 0.02	0.033 ± 0.001	21.1 ± 1.3	4096	2048
PFHM	2.51 ± 0.08	0.031 ± 0.001	21.7 ± 0.4	256	128

Anexo 4. Caracterización del Hibridoma anti-B clon C6G4 en medio de cultivo RPMI 1640 y PFHM respectivamente. *Tomado de Justiz, 2013.*

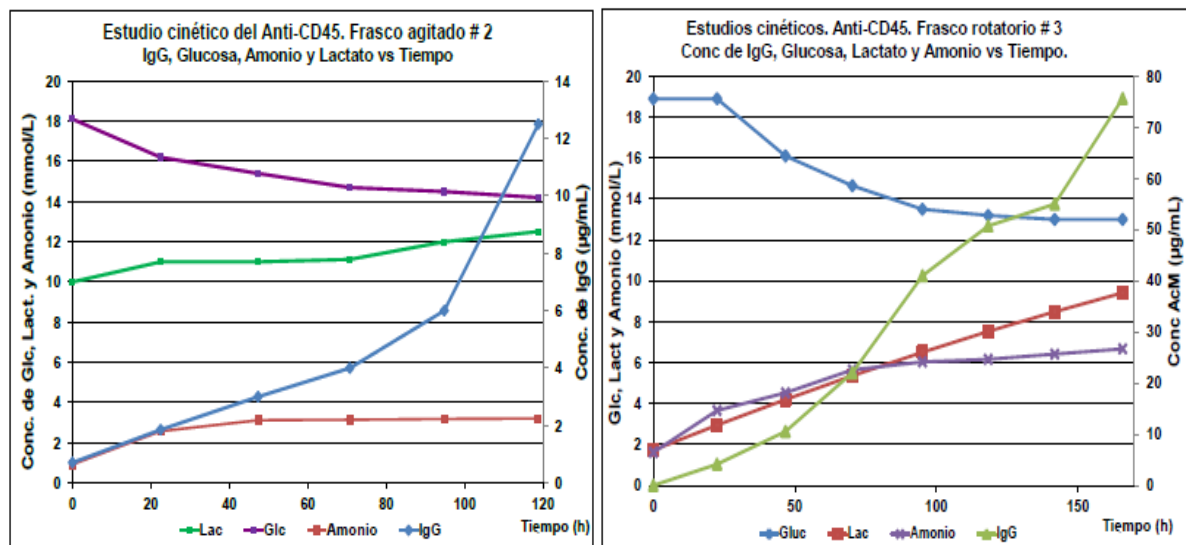
Tiempo (horas)	X_v (MC/mL)	X_d (MC/mL)	X_t (MC/mL)	Viab (%)	IgG (mg/L)	Potencia	
						B	A ₁ B
0	0,23	0,03	0,26	90	1,59	0	0
24	0,37	0,02	0,39	96	4,28	0	0
48	0,86	0,02	0,88	98	12,10	0	2
72	1,49	0,11	1,60	93	13,70	0	2
96	1,04	0,23	1,27	82	17,28	2	2
120	0,84	0,31	1,15	73	17,91	2	2
144	0,62	0,41	1,03	60	20,08	2	4
168	0,53	0,65	1,18	45	24,23	4	4
192	0,45	0,96	1,41	32	30,44	4	4
216	0,32	1,07	1,39	23	31,73	4	4
240	0,23	1,05	1,28	18	32,40	4	4

Tiempo (horas)	Xv (MC/mL)	Xd (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	IgG (mg/L)	Potencia B	A ₁ B
0	0,22	0,02	0,24	91	1,23	0	0
24	0,21	0,02	0,23	91	3,11	0	0
48	0,68	0,03	0,71	96	10,70	2	2
72	1,66	0,14	1,80	92	18,51	2	4
96	1,15	0,38	1,53	75	31,11	4	4
120	0,95	0,33	1,28	74	39,00	4	4
144	0,79	0,32	1,11	71	44,34	8	4
168	0,69	0,41	1,10	63	52,35	8	4
192	0,54	0,50	1,04	52	58,00	8	8
216	0,51	0,83	1,34	38	61,77	16	8
240	0,48	0,93	1,41	34	63,41	16	8
264	0,27	1,66	1,93	14	67,35	16	16

Anexo 5. Valores máximos de las variables de cultivo medidas en medio RPMI 1640+ SFB al 8%, PFHM-II y MyeloCIM. Tomado de Miranda, 2010.

Medios	Xv máx (x 10 ⁶ cel/mL)	IgG máx (mg/L)
RPMI 1640	1,54	19,01
PFHM-II	1,93	164,60
MyeloCIM	1,38	67,25

Anexo 6. Valores del comportamiento de las concentraciones de los nutrientes, metabolitos y anticuerpo en un estudio en batch del hibridoma α -CD45 en frascos rotatorios usando el medio de cultivo PFHM-II y PFHM-II con 10 mg/L de Insulina respectivamente. Tomado de Hernández, 2014.



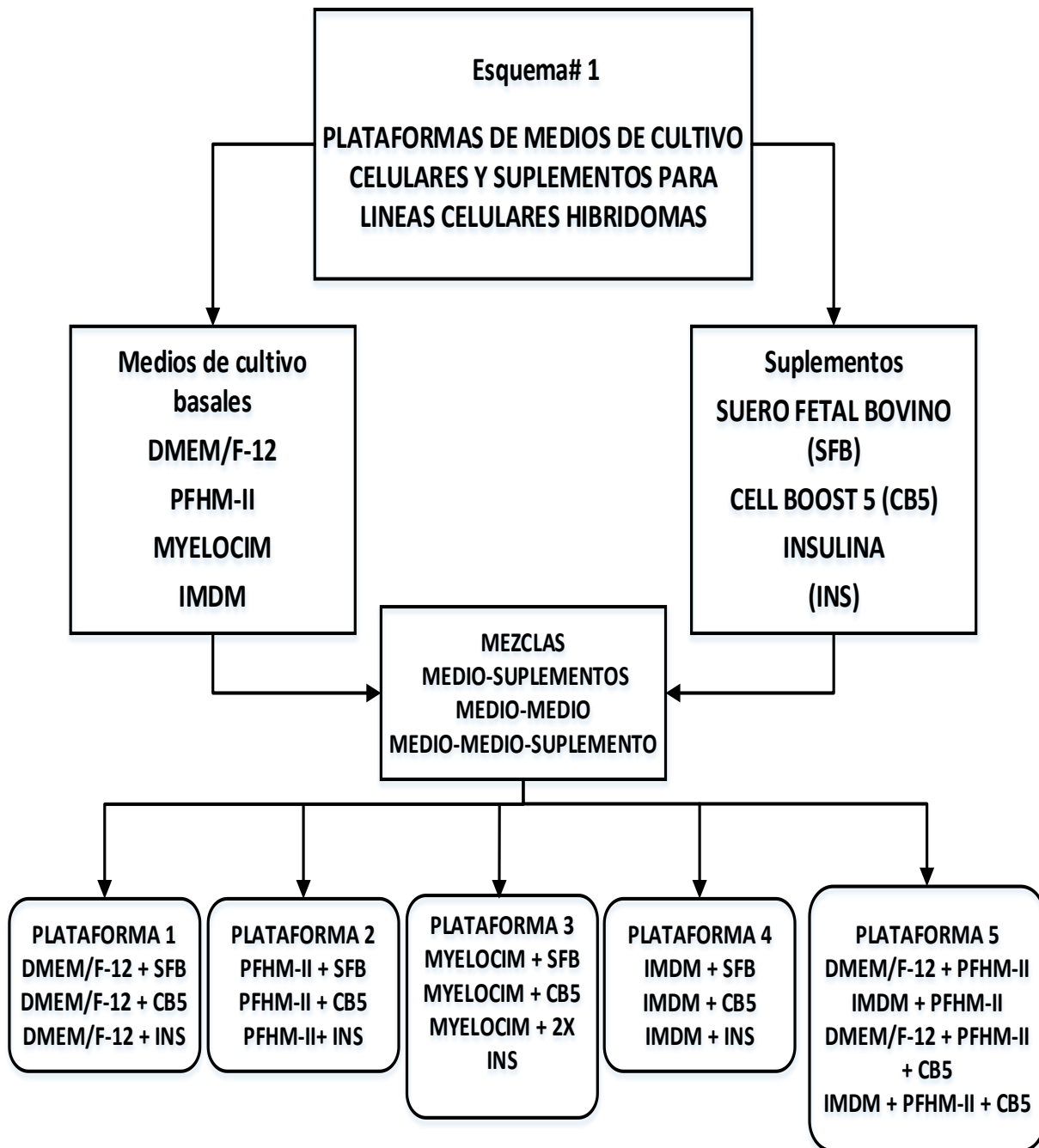
Anexo 7. Resumen de los parámetros cinéticos del Hibridoma anti-B en medio PFHM-II, PFHM-II con insulina y PFHM-II con en modo de fermentación por lote, en frascos rotatorios. *Tomado de Casado, 2017*

Frasco	$Xv_{\text{máx}}$ ($10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	td (h)	Potencia máx.	
				Fenotipo	
				B	AB
PFHM	2.51 ± 0.08^b	0.031 ± 0.001^b	21.7 ± 0.4^a	256	128
PFHM+INS	3.38 ± 0.06^a	0.037 ± 0.001^a	18.6 ± 0.5^b	256	128
PFHM+ 8mM GLUT	2.49 ± 0.06^b	0.032 ± 0.001^b	22.0 ± 0.4^a	256	128

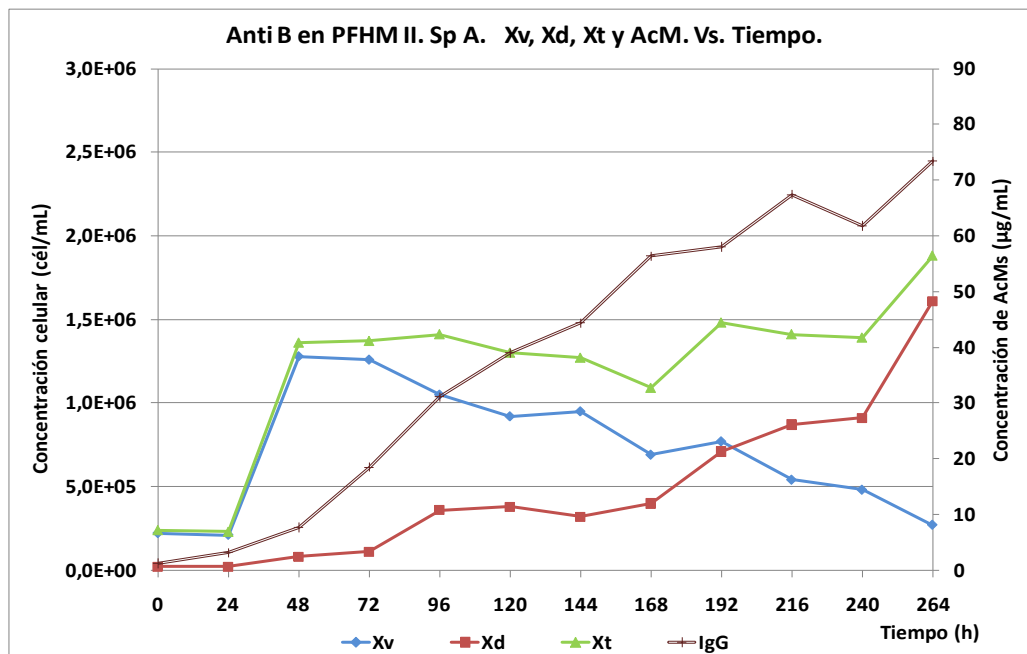
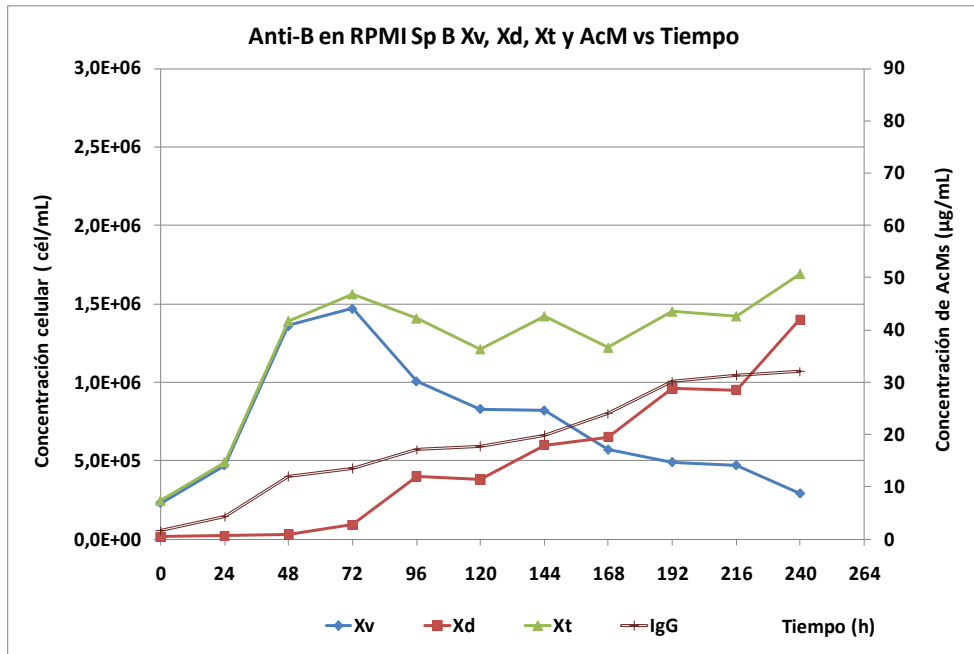
Anexo 8. Componentes de las Variantes de Cell Boost comercializadas como suplementos para cultivo celular. *Tomado de General Electric Healthcare, 2016. Disponible en: <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=17792>. Consultado el 9 de abril de 2020.*

	Amino acids	Vitamins	Glucose	Trace elements	Growth factors	Hypoxanthine/thymidine	ADCF* lipids	ADCF* cholesterol	Suitable for
Cell Boost 1 Supplement (R05.2)	•	•	•						HEK293 CHO
Cell Boost 2 Supplement (R15.4)	•		•						PER.C6™ CHO
Cell Boost 3 Supplement (JM3.5)	•	•	•	•		•			Hybridoma Myeloma
Cell Boost 4 Supplement (PS307)	•	•	•	•	•		•	•	CHO
Cell Boost 5 Supplement (CN-F)	•	•	•	•	•	•	•	•	Hybridoma NS0 HEK293 CHO
Cell Boost 6 Supplement (CN-T)	•	•	•	•	•	•	•	•	T-Cells Hybridoma NS0 HEK293 CHO

Anexo 9. Plataforma de Medios propuestos para el cultivo del hibridoma anti-B en LABEX.



Anexo 10. Caracterización cinética del Hibridoma Anti-B (clon C6G4) en los medios de cultivo RPMI 1640 y PFHM-II. Tomado de Zorrilla, 2010.



Anexo 11. Composición de los nutrientes del Medio de cultivo DMEM/F-12 utilizado en la caracterización cinética, Numero de Catalogo 125000096. Disponible en <https://www.thermofisher.com/es/es/home/technical-resources/media-formulation.60.html>. Consultado el 20 febrero de 2020.

Technical Resources - Media Formulations

12500 - DMEM/F-12, powder

- **Catalog Number(s)**

[12500062](#), [12500096](#)

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75.0	18.75	0.25
L-Alanine	89.0	4.45	0.049999997
L-Arginine hydrochloride	211.0	147.5	0.69905216
L-Asparagine-H ₂ O	150.0	7.5	0.05
L-Aspartic acid	133.0	6.65	0.05
L-Cysteine hydrochloride-H ₂ O	176.0	17.56	0.09977272
L-Cystine 2HCl	313.0	31.29	0.09996805
L-Glutamic Acid	147.0	7.35	0.05
L-Glutamine	146.0	365.0	2.5
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	210.0	31.48	0.14990476
L-Isoleucine	131.0	54.47	0.41580153
L-Leucine	131.0	59.05	0.45076334
L-Lysine hydrochloride	183.0	91.25	0.4986339
L-Methionine	149.0	17.24	0.11570469
L-Phenylalanine	165.0	35.48	0.2150303
L-Proline	115.0	17.25	0.15
L-Serine	105.0	26.25	0.25
L-Threonine	119.0	53.45	0.44915968
L-Tryptophan	204.0	9.02	0.04421569
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	261.0	55.79	0.21375479
L-Valine	117.0	52.85	0.4517094
Vitamins			
Biotin	244.0	0.0035	1.4344263E-5
Choline chloride	140.0	8.98	0.06414285
D-Calcium pantothenate	477.0	2.24	0.0046960167
Folic Acid	441.0	2.65	0.0060090707
Niacinamide	122.0	2.02	0.016557377
Pyridoxine hydrochloride	206.0	2.013	0.009771844
Riboflavin	376.0	0.219	5.824468E-4
Thiamine hydrochloride	337.0	2.17	0.0064391694

Vitamin B12	1355.0	0.68	5.0184503E-4
i-Inositol	180.0	12.6	0.07
Inorganic Salts			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111.0	116.6	1.0504504
Cupric sulfate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	250.0	0.0013	5.2E-6
Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404.0	0.05	1.2376238E-4
Ferric sulfate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	278.0	0.417	0.0015
Magnesium Chloride (anhydrous)	95.0	28.64	0.30147368
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	120.0	48.84	0.407
Potassium Chloride (KCl)	75.0	311.8	4.1573334
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	6995.5	120.61207
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄) anhydrous	142.0	71.02	0.50014085
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138.0	62.5	0.45289856
Zinc sulfate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	288.0	0.432	0.0015
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	3151.0	17.505556
Hypoxanthine Na	159.0	2.39	0.015031448
Linoleic Acid	280.0	0.042	1.4999999E-4
Lipoic Acid	206.0	0.105	5.097087E-4
Phenol Red	376.4	8.1	0.021519661
Putrescine 2HCl	161.0	0.081	5.031056E-4
Sodium Pyruvate	110.0	55.0	0.5
Thymidine	242.0	0.365	0.0015082645

Anexo 12. Composición Nutriente del medio de cultivo HAM F-12. Disponible en http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell_esp_bulahamf12.html. Consultado el 16 mayo del 2020.

SALES INORGÁNICAS	mg/L	L-valina	11,70
CaCl ₂ ·2H ₂ O	44,100	L-Serina	10,50
CuSO ₄ ·H ₂ O	0,0025	L-treonina	11,90
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,834	L-triptófano	2,04
KCl	285,000	L-tirosina	7,78
MgCl ₆ H ₂ O	123,000	VITAMINAS	
NaCl	7.599.000		mg/L
NaHCO ₃	1.176,000	Biotina	0,0073
Na ₂ HPO ₄	142,040	Pantotenato de Calcio	0,480
		Cloruro de colina	13.960
		Ácido Fólico	13.960

AMINOÁCIDOS	mg/L	Inositol	18.000
L-alanina	9,00	Niacinamida	0.037
L-arginina.HCL	211,00	Piridoxina.HCl	0,062
L-asparagina.H2O	15,01	Riboflavina	0,0380
L-ácido aspártico	13,00	Tiamina	0.340
L-cisteína	35,00	Vitamina B-12	1,360
L-ácido glutámico	14,70		
L-glutamina	146,00	OTROS COMPONENTES	mg/L
Glicina	7,58	Glucosa	1.802,00
L-histidina.HCl.H2O	23,00	Hipoxantina	4,00
L-isoleucina	3.94	Ácido Tiotico	0,21
L-leucina	13,00	Ácido Lipoico	0,084
L-lisina	36.5	Putrecina	0,161
L-metionina	4,48	Rojo de Fenol	1,30
L-fenilalanina	5,00	Piruvato de Sodio	110,00
L-prolina	34.50	Timidina	0,73

Anexo 13. Composicion de los nutrientes del medio de cultivo RPMI 1640. Disponible en <https://www.thermofisher.com/es/es/home/technical-resources/media-formulation.190.html>.

Consultado el 20 de febrero de 2020

Technical Resources - Media Formulations

13018 - RPMI 1640, powder, HEPES

- Catalog Number(s)

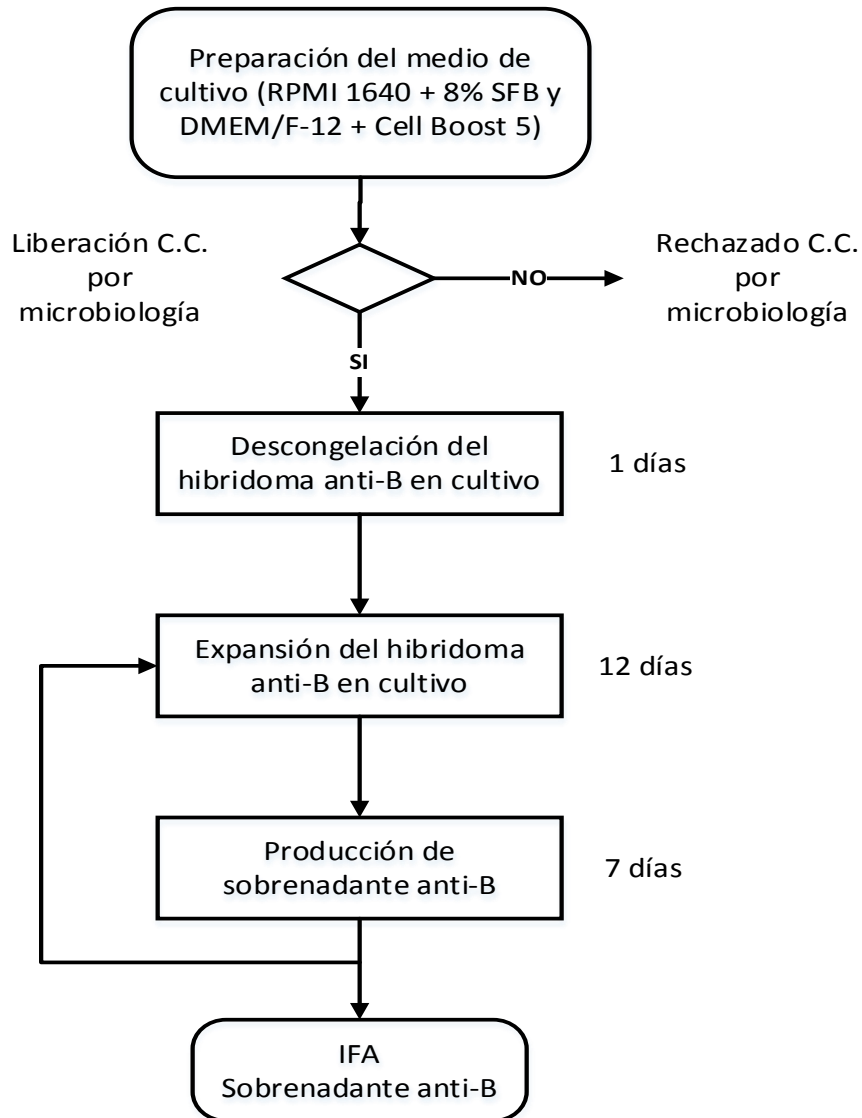
[13018015](#), [13018031](#)

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75.0	10.0	0.13333334
L-Arginine	174.0	200.0	1.1494253
L-Asparagine	132.0	50.0	0.37878788
L-Aspartic acid	133.0	20.0	0.15037593
L-Cystine 2HCl	313.0	65.15	0.20814697
L-Glutamic Acid	147.0	20.0	0.13605443

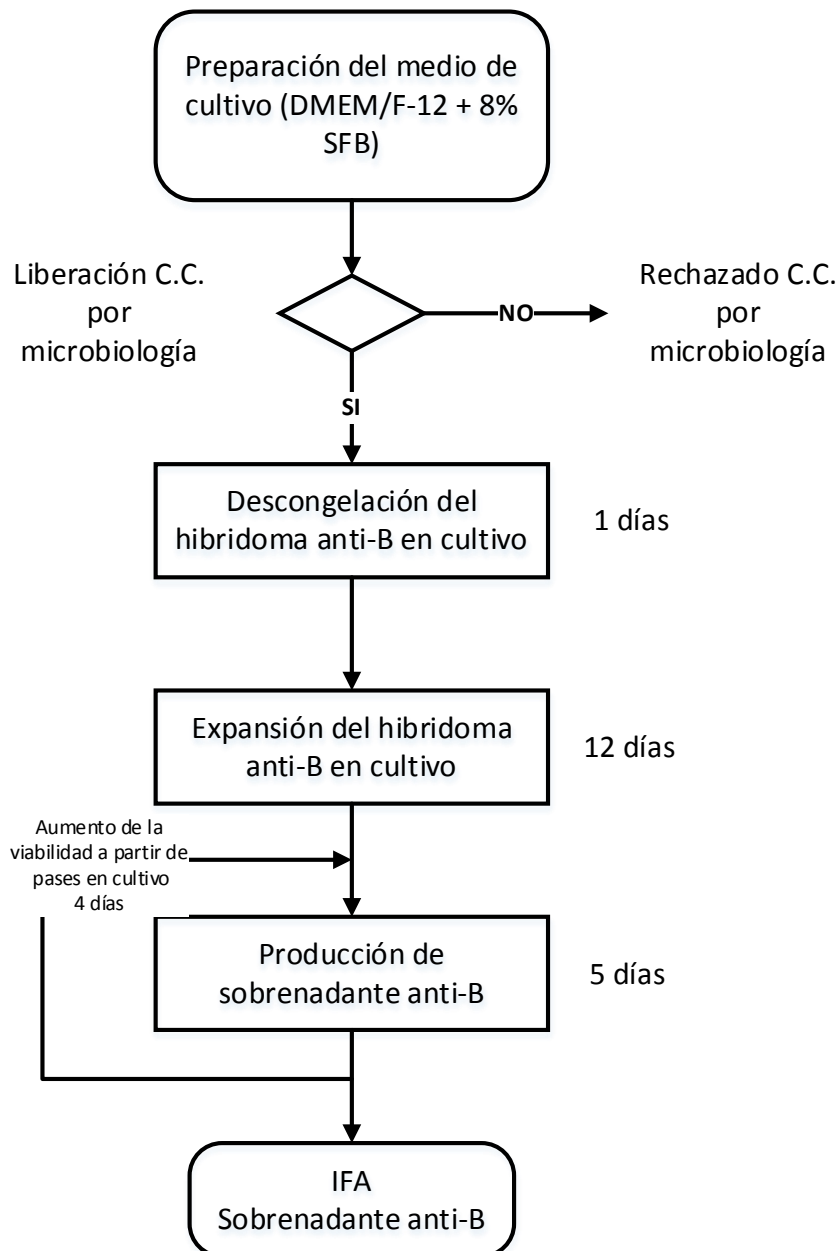
Producción de sobrenadante anti-B en un medio de cultivo alternativo
Anexos

L-Glutamine	146.0	300.0	2.0547945
L-Histidine	155.0	15.0	0.09677419
L-Hydroxyproline	131.0	20.0	0.15267175
L-Isoleucine	131.0	50.0	0.3816794
L-Leucine	131.0	50.0	0.3816794
L-Lysine hydrochloride	146.0	40.0	0.2739726
L-Methionine	149.0	15.0	0.10067114
L-Phenylalanine	165.0	15.0	0.09090909
L-Proline	115.0	20.0	0.17391305
L-Serine	105.0	30.0	0.2857143
L-Threonine	119.0	20.0	0.16806723
L-Tryptophan	204.0	5.0	0.024509804
L-Tyrosine disodium salt	225.0	28.94	0.12862222
L-Valine	117.0	20.0	0.17094018
Vitamins			
Biotin	244.0	0.2	8.1967213E-4
Choline chloride	140.0	3.0	0.021428572
D-Calcium pantothenate	477.0	0.25	5.24109E-4
Folic Acid	441.0	1.0	0.0022675737
Niacinamide	122.0	1.0	0.008196721
Para-Aminobenzoic Acid	137.0	1.0	0.00729927
Pyridoxine hydrochloride	206.0	1.0	0.004854369
Riboflavin	376.0	0.2	5.319149E-4
Thiamine hydrochloride	337.0	1.0	0.002967359
Vitamin B12	1355.0	0.005	3.690037E-6
i-Inositol	180.0	35.0	0.19444445
Inorganic Salts			
Calcium nitrate (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236.0	100.0	0.42372882
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	120.0	48.84	0.407
Potassium Chloride (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	5500.0	94.82758
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄) anhydrous	142.0	800.0	5.633803
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	2000.0	11.111111
Glutathione (reduced)	307.0	1.0	0.0032573289
HEPES	238.0	5958.0	25.033613
Phenol Red	376.4	5.0	0.013283741

Anexo 14. Diagrama del proceso productivo propuesto para el sobrenadante anti-B, utilizando como medio de cultivo el RPMI 1640 y DMEM/F-12 + Cell Boost 5.



Anexo 15. Diagrama del proceso productivo propuesto para el sobrenadante anti-B, utilizando como medio de cultivo el DMEM/F-12 + 8% de SFB.



Anexo 16. Ficha de costo de la propuesta de producción de sobrenadante anti-B empleando el medio de cultivo RPMI 1640 + 8% SFB.

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B			Cantidad (mL)	Resultado		# Ficha	
Etapa: Preparación de medios y soluciones			10000	Medio RPMI 1640 + 8% SFB		6	
Materias Primas y Materiales	U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
	M		CUC	MN	CUC	MN	UM
RPMI 1640	g	104	1.005140	0.000000	104.535	0.000	104.535
Hepes	g	43	0.857436	0.040916	36.870	1.759	38.629
Bicarbonato de Sodio	g	20	0.017160	0.000728	0.343	0.015	0.358
L-glutamina	g	3	0.000000	0.002000	0.000	0.006	0.006
Piruvato de Sodio	g	1.1	1.501773	0.216047	1.652	0.238	1.890
Agua Purificada	ml	9190	0.000000	0.000040	0.000	0.368	0.368
Suero Fetal Bovino	ml	800	0.314049	0.000000	251.239	0.000	251.239
2-Mercaptoetanol al 0,5%	ml	10	0.035535	0.204050	0.355	2.041	2.396
Etanol 70º	ml	300	0.003644	0.021024	1.093	6.307	7.400
Frasco roller de 850cm ²	U	5	0.523583	0.000000	2.618	0.000	2.618
Filtro capsula Sartobran 300	U	1	426.207660	0.000000	426.208	0.000	426.208
Punta azul	U	3	0.045523	0.007518	0.137	0.023	0.159
Torunda	U	3	0.002024	0.002861	0.006	0.009	0.015
Guantes estériles sin talco	par	2	0.366642	0.049950	0.733	0.100	0.833
TOTAL			3.7347	0.4848	825.7885	10.8639	836.6525
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		SALARIO ESCALA	TARIFA HORARIA	Horas TRABAJ.	Importe		
					CUC	MN	
Especialista III en IID (+0,9)		575.00	3.016789	4.0	0.0000	12.067	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.806925	4.0	0.0000	11.228	
						0.000	
						0.000	
						0.000	
						0.000	
Sub-Total			18.51	8.0	0.0000	23.295	
Acumulación de Vacaciones 9.09%						2.118	
Sub-Total						25.412	
Contrib. A la Seg. Social 12.5%						3.177	
TOTAL				8.0	0.0000	28.589	
Costo Indirecto Aplicado		Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice CUC 30%	IMPORTE CUC 30% MN	TOTAL UM
Coeficiente Aplicado		2.12	8.00	16.96		5.088 11.872	16.960
Costo total de resultado						830.877 51.325	882.201
Costo unitario de resultado (mL)						0.083 0.005	0.088

Producción de sobrenadante anti-B en un medio de cultivo alternativo

Anexos

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (ml)	Resultado		# Ficha		
Etapa: Producción de sobrenadante		33000	Sobrenadante anti -B		7		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
			CUC	MN	CUC	MN	UM
Medio RPMI 1640+SFB	mL	33000	0.08309	0.00513	2,741.893	169.372	2,911.265
Tripán azul al 0,4%	mL	10	0.09540	0.31941	0.954	3.194	4.148
Etanol 70º	mL	7000	0.00364	0.02102	25.507	147.168	172.676
Banco de trabajo anti-B	criovial	1	3.14218	11.15496	3.142	11.155	14.297
Placa de 24 pozos	U	1	0.04154	0.00028	0.042	0.000	0.042
Pipeta Serológica de 5 mL	U	80	0.60268	0.00000	48.214	0.000	48.214
Pipeta Serológica de 10 mL	U	20	0.70564	0.05210	14.113	1.042	15.155
Pipeta Serológica de 25 mL	U	20	0.38774	0.04724	7.755	0.945	8.700
Pipeta Serológica de 50 mL	U	15	0.49975	0.03325	7.496	0.499	7.995
Frasco de cultivo de 25 cm²	U	3	0.69560	0.01570	2.087	0.047	2.134
Frasco de cultivo de 75 cm²	U	4	1.32618	0.13129	5.305	0.525	5.830
Frasco de cultivo de 175 cm²	U	6	2.15178	0.10900	12.911	0.654	13.565
Frasco roller de 850cm²	U	12	4.69290	0.18340	56.315	2.201	58.516
Tubo de centrifuga de 50 mL	U	2	0.11230	0.00000	0.225	0.000	0.225
Tubo de centrifuga de 175 mL	U	10	0.00000	0.00050	0.000	0.005	0.005
Vial de 1,5 mL	U	50	0.00470	0.00860	0.235	0.430	0.665
Punta amarilla	U	30	0.03848	0.00322	1.154	0.096	1.251
Torunda	U	100	0.00202	0.00286	0.202	0.286	0.489
Guantes estériles	Par	25	0.36664	0.04995	9.166	1.249	10.415
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales					194.823	169.496	364.319
SALARIO DIRECTO		SALARIO ESCALA	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	
Especialista Principal (+0,9)		635.00	3.33158447	720	0	2398.741	
Especialista III en IID (+0,9)		575.00	3.01678909	720	0	2172.088	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.80692550	720	0	2020.986	
Sub - Total				2160.0	0.0	6591.815	
Vacaciones Acum.9.09%						599.196	
Sub - Total						7191.011	
Seguridad Social 12,5%						898.876	
Total				2160.0	0.00	8089.888	
Costo Indirecto Aplicado	Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE		Total
				CUC 30%	CUC 30%	MN	UM
Coefficiente Aplicado	2.12	2160.0	4579.2000		1373.760	3205.440	4579.200
Costo total de resultado					1568.583	11464.824	13033.407
Costo unitario de resultado					0.048	0.347	0.395

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (ml)	Resultado		# Ficha		
Etapas: Formulación		10000	Formulado anti - B		8		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
			CUC	MN	CUC	MN	UM
Albúmina Sérica Bovina 30 %	mL	667	0.00000	1.42314	0.000	948.758	948.758
Cloruro de Sodio	g	40	0.00695	0.00136	0.278	0.054	0.332
Cloruro de Potasio	g	1	1.20998	0.00155	1.210	0.002	1.212
Dihidrógeno Fosfato de Potasio	g	1	0.00000	0.21041	0.000	0.210	0.210
Hidrógeno Fosfato disódico	g	5.8	0.00000	0.20410	0.000	1.184	1.184
Acida Sódica	g	10	0.00000	0.20143	0.000	2.014	2.014
Acriflavina	g	0.05	0.00000	1.48265	0.000	0.074	0.074
Guantes	par	4	0.36664	0.04995	1.467	0.200	1.666
Membranade 0,2µm (Ø142mm)	u	1	2.89020	0.11560	2.890	0.116	3.006
Membrana de 0,45µm (Ø142mm)	u	1	4.62970	0.00000	4.630	0.000	4.630
Membrana Prefiltro 50µm (Ø130mm)	u	1	1.41000	0.00000	1.410	0.000	1.410
Sobrenadante anti-B	mL	9333	0.04753	0.34742	443.640	3,242.577	3,686.216
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales			10.561	4.038	11.885	952.612	964.497
SALARIO DIRECTO		SALARIO ESCALA	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPAC.Y ESCALA					CUC	MN	
Especialista Principal (+0.9)		635.00	3.3315845	8.0		26.65	
Especialista III en II+D		575.00	3.0167891	8.0		24.13	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.8069255	8.0		22.46	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.8069255	8.0		22.46	
Sub - Total				32.0	0.0	95.70	
Vacaciones Acum.9.09%						8.70	
Sub - Total						104.40	
Seguridad Social 12,5%						13.05	
Total				32.0	0.00	117.45	
Costo Indirecto Aplicado	Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE		Total
				CUC 30%	CUC 30%	MN	UM
Coefficiente Aplicado	2.12	32.00	67.84		20.352	47.488	67.840
Costo total de resultado					32.237	1117.547	1149.783
Costo unitario de resultado					0.003	0.112	0.115

Producción de sobrenadante anti-B en un medio de cultivo alternativo

Anexos

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción		Resultado		# Ficha	
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (Frasco)		Llenado Sobrenadante anti-B		9	
Etapa: Llenado		1000					
Materias Primas y Materiales	U	Cantid.	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
	M		CUC	MN	CUC	MN	
Guantes	par	7	0.366642	0.049950	2.566	0.350	2.916
Frascos de vidrio GL-18	u	1000	0.096700	0.002000	96.700	2.000	98.700
Conjuntos cuenta gotas	u	1000	0.006300	0.037200	6.300	37.200	43.500
Formulado anti-B	mL	5500	0.003224	0.111755	17.730	614.651	632.381
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales			0.4729	0.20090	105.5665	39.5497	145.116
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPAC. Y ESCALA		ESCALA	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	
Especialista Principal (+0,9)		635.00	3.33158447	8	0	26.653	
Especialista III en II+D		575.00	3.01678909	8	0	24.134	
Técnico Innovador I Nivel (0,9)		535.00	2.80692550	8	0	22.455	
Técnico Innovador II Nivel (0,9)		515.00	2.70199370	8	0	21.616	
Técnico de producción (0,9)		495.00	2.59706191	8	0	20.776	
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(0,9)		395.00	2.07240294	8	0	16.579	
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(0,9)		395.00	2.07240294	8	0	16.579	
Sub - Total				56	0.0	148.793	
Vacaciones Acum.9.09%						13.525	
Sub - Total						162.319	
Seguridad Social 12,5%						20.290	
Total				56.0	0.00	182.608	
Costo Indirecto Aplicado		Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE	
Coeficiente Aplicado		2.12	56.0	118.72	CUC 30%	CUC 30%	MN
Costo total de resultado						35.616	83.104
Costo unitario de resultado						0.141	0.305
							118.720
							446.445
							0.446

LABEX							
Ficha de costo		Departamento: Producción		Resultado		# Ficha	
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (Frasco)		Llenado Sobrenadante anti-B		10	
ETAPA: Producto terminado		1000					
Materias Primas y Materiales	U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
	M		CUC	MN	CUC	MN	
Estuche	u	1000	0.080400	0.069600	80.400	69.600	150.000
Literatura Interior	u	1000	0.039300	0.063100	39.300	63.100	102.400
Etiquetas	u	1250	0.044900	0.010700	56.125	13.375	69.500
ior Hemo-CIM SC anti-B	frasco	1000	0.141182	0.305262	141.182	305.262	446.445
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales			0.30578	0.4487	175.8250	146.1	321.9
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPAC. Y ESCALA		ESCALA	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	
Especialista Pricipal (+0,9)		635.00	3.3315845	8	0.00	26.65	
Especialista III en II+D (+0,9)		575.00	3.0167891	8	0.00	24.13	
Técnico Innovador I Nivel (+0,9)		535.00	2.8069255	8	0.00	22.46	
Técnico Innovador II Nivel (+0,9)		515.00	2.7019937	8	0.00	21.62	
Técnico de producción (+0,9)		495.00	2.5970619	8	0.00	20.78	
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(+0,9)		395.00	2.0724029	8	0.00	16.58	
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(+0,9)		395.00	2.0724029	8	0.00	16.58	
Sub - Total				56	0.00	148.79	
Vacaciones Acum.9.09%						13.53	
Sub - Total						162.32	
Seguridad Social 12,5%						20.29	
Total					0.00	182.61	
Costo Indirecto Aplicado		Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE	
Coeficiente Aplicado		2.1200	56.0	118.720	CUC 30%	CUC 30%	MN
Costo total de resultado						35.6160	83.1040
Costo unitario de resultado						0.2114	0.4118
							118.7200
							623.2284
							0.6232

Anexo 17. Ficha de costo de la propuesta de producción de sobrenadante anti-B empleando el medio de cultivo DMEM/F-12 + 8% SFB.

LABEX							
Fichas de Costo			Departamento: Producción				
Producto: Hemoclasificador anti-B			Cantidad (mL)	Resultado		# Ficha	
Etapa: Preparación de medios y soluciones			10000	Medio DMEM/F-12 + 8% SFB		6	
Materias Primas y Materiales	U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
	M		CUC	MN	CUC	MN	UM
DMEM/F-12	g	120	0.505138	0.077062	60.617	9.247	69.864
Hepes	g	43	0.857436	0.040916	36.870	1.759	38.629
Bicarbonato de Sodio	g	20	0.017160	0.000728	0.343	0.015	0.358
L-glutamina	g	3	0.000000	0.002000	0.000	0.006	0.006
Piruvato de Sodio	g	1.1	1.501773	0.216047	1.652	0.238	1.890
Agua Purificada	ml	9190	0.000000	0.000040	0.000	0.368	0.368
Suero Fetal Bovino	ml	800	0.314049	0.000000	251.239	0.000	251.239
2-Mercaptoetanol al 0,5%	ml	10	0.035535	0.204050	0.355	2.041	2.396
Etanol 70º	ml	300	0.003644	0.021024	1.093	6.307	7.400
Frasco roller de 850cm ²	U	5	0.523583	0.000000	2.618	0.000	2.618
Filtro capsula Sartobran 300	U	1	426.207660	0.000000	426.208	0.000	426.208
Punta azul	U	3	0.045523	0.007518	0.137	0.023	0.159
Torunda	U	3	0.002024	0.002861	0.006	0.009	0.015
Guantes estériles sin talco	par	2	0.366642	0.049950	0.733	0.100	0.833
TOTAL			3.2347	0.5619	781.8705	20.1114	801.9819
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		SALARIO ESCALA	TARIFA HORARIA	Horas TRABAJ.	Importe		
					CUC	MN	
Especialista III en IID (+0,9)		575.00	3.016789	4.0	0.0000	12.067	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.806925	4.0	0.0000	11.228	
						0.000	
						0.000	
						0.000	
						0.000	
Sub-Total			18.51	8.0	0.0000	23.295	
Acumulación de Vacaciones 9.09%						2.118	
Sub-Total						25.412	
Contrib. A la Seg. Social 12.5%						3.177	
TOTAL				8.0	0.0000	28.589	
Costo Indirecto Aplicado		Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice CUC 30%	IMPORTE CUC 30%	TOTAL UM
Coeficiente Aplicado		2.12	8.00	16.96		5.088	11.872 16.960
Costo total de resultado						786.959	60.572 847.531
Costo unitario de resultado (mL)						0.079	0.006 0.085

Producción de sobrenadante anti-B en un medio de cultivo alternativo

Anexos

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (ml)	Resultado		# Ficha		
Etapa: Producción de sobrenadante		33000	Sobrenadante anti -B		7		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
			CUC	MN	CUC	MN	UM
Medio DMEM+SFB	mL	33000	0.07870	0.00606	2,596.963	199.889	2,796.852
Tripán azul al 0,4%	mL	10	0.09540	0.31941	0.954	3.194	4.148
Etanol 70º	mL	7000	0.00364	0.02102	25.507	147.168	172.676
Banco de trabajo anti-B	criovial	1	3.14218	11.15496	3.142	11.155	14.297
Placa de 24 pozos	U	1	0.04154	0.00028	0.042	0.000	0.042
Pipeta Serológica de 5 mL	U	80	0.60268	0.00000	48.214	0.000	48.214
Pipeta Serológica de 10 mL	U	20	0.70564	0.05210	14.113	1.042	15.155
Pipeta Serológica de 25 mL	U	20	0.38774	0.04724	7.755	0.945	8.700
Pipeta Serológica de 50 mL	U	15	0.49975	0.03325	7.496	0.499	7.995
Frasco de cultivo de 25 cm²	U	3	0.69560	0.01570	2.087	0.047	2.134
Frasco de cultivo de 75 cm²	U	4	1.32618	0.13129	5.305	0.525	5.830
Frasco de cultivo de 175 cm²	U	6	2.15178	0.10900	12.911	0.654	13.565
Frasco roller de 850cm²	U	12	4.69290	0.18340	56.315	2.201	58.516
Tubo de centrifuga de 50 mL	U	2	0.11230	0.00000	0.225	0.000	0.225
Tubo de centrifuga de 175 mL	U	10	0.00000	0.00050	0.000	0.005	0.005
Vial de 1,5 mL	U	50	0.00470	0.00860	0.235	0.430	0.665
Punta amarilla	U	30	0.03848	0.00322	1.154	0.096	1.251
Torunda	U	100	0.00202	0.00286	0.202	0.286	0.489
Guantes estériles	Par	25	0.36664	0.04995	9.166	1.249	10.415
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales					194.823	169.496	3,161.171
SALARIO DIRECTO		SALARIO ESCALA	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	
Especialista Principal (+0.9)		635.00	3.33158447	280	0	932.844	
Especialista III en IID (+0.9)		575.00	3.01678909	280	0	844.701	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0.9)		535.00	2.80692550	280	0	785.939	
Sub - Total				840.0	0.0	2563.484	
Vacaciones Acum.9.09%						233.021	
Sub - Total						2796.504	
Seguridad Social 12,5%						349.563	
Total				840.0	0.00	3146.067	
Costo Indirecto Aplicado	Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE		Total
				CUC 30%	CUC 30%	MN	UM
Coeficiente Aplicado	2.12	840.0	1780.8000		534.240	1246.560	1780.800
Costo total de resultado					729.063	4562.124	5291.187
Costo unitario de resultado					0.022	0.138	0.160

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (ml)	Resultado		# Ficha		
Etapas: Formulación		10000	Formulado anti - B		8		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
			CUC	MN	CUC	MN	UM
Albúmina Sérica Bovina 30 %	mL	667	0.00000	1.42314	0.000	948.758	948.758
Cloruro de Sodio	g	40	0.00695	0.00136	0.278	0.054	0.332
Cloruro de Potasio	g	1	1.20998	0.00155	1.210	0.002	1.212
Dihidrógeno Fosfato de Potasio	g	1	0.00000	0.21041	0.000	0.210	0.210
Hidrógeno Fosfato disódico	g	5.8	0.00000	0.20410	0.000	1.184	1.184
Acida Sódica	g	10	0.00000	0.20143	0.000	2.014	2.014
Agua Purificada	mL	6833	0.00000	0.00004	0.000	0.273	0.273
Acriflavina	g	0.05	0.00000	1.48265	0.000	0.074	0.074
Guantes	par	4	0.36664	0.04995	1.467	0.200	1.666
Membranade 0,2µm (Ø142mm)	u	1	2.89020	0.11560	2.890	0.116	3.006
Membrana de 0,45µm (Ø142mm)	u	1	4.62970	0.00000	4.630	0.000	4.630
Membrana Prefiltro 50µm (Ø130mm)	u	1	1.41000	0.00000	1.410	0.000	1.410
Sobrenadante anti-B	mL	2500	0.02209	0.13825	55.232	345.615	400.847
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales			10.513	3.690	11.885	952.886	964.770
SALARIO DIRECTO		SALARIO ESCALA	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPAC.Y ESCALA					CUC	MN	
Especialista Principal (+0.9)		635.00	3.3315845	8.0		26.65	
Especialista III en II+D		575.00	3.0167891	8.0		24.13	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.8069255	8.0		22.46	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.8069255	8.0		22.46	
Sub - Total				32.0	0.0	95.70	
Vacaciones Acum.9.09%						8.70	
Sub - Total						104.40	
Seguridad Social 12,5%						13.05	
Total				32.0	0.00	117.45	
Costo Indirecto Aplicado	Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE		Total
				CUC 30%	CUC 30%	MN	UM
Coeficiente Aplicado	2.12	32.00	67.84		20.352	47.488	67.840
Costo total de resultado					32.237	1117.820	1150.056
Costo unitario de resultado					0.003	0.112	0.115

Producción de sobrenadante anti-B en un medio de cultivo alternativo

Anexos

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (Frasco)		Resultado		# Ficha	
Etapa: Llenado		1000		Llenado Sobrenadante anti-B		9	
Materias Primas y Materiales	U	Cantid.	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
	M		CUC	MN	CUC	MN	
Guantes	par	7	0.366642	0.049950	2.566	0.350	2.916
Frascos de vidrio GL-18	u	1000	0.096700	0.002000	96.700	2.000	98.700
Conjuntos cueta gotas	u	1000	0.006300	0.037200	6.300	37.200	43.500
Formulado anti-B	mL	5500	0.003224	0.111782	17.730	614.801	632.531
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales			0.4729	0.20093	105.5665	39.5497	145.116
SALARIO DIRECTO			SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE	
CATEGORIA OCUPAC. Y ESCALA			ESCALA	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN
Especialista Principal (+0,9)			635.00	3.33158447	8	0	26.653
Especialista III en II+D			575.00	3.01678909	8	0	24.134
Técnico Innovador I Nivel (0,9)			535.00	2.80692550	8	0	22.455
Técnico Innovador II Nivel (0,9)			515.00	2.70199370	8	0	21.616
Técnico de produccion (0,9)			495.00	2.59706191	8	0	20.776
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(0,9)			395.00	2.07240294	8	0	16.579
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(0,9)			395.00	2.07240294	8	0	16.579
Sub - Total					56	0.0	148.793
Vacaciones Acum.9.09%							13.525
Sub - Total							162.319
Seguridad Social 12,5%							20.290
Total					56.0	0.00	182.608
Costo Indirecto Aplicado		Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE	
					CUC 30%	CUC 30%	MN UM
Coeficiente Aplicado		2.12	56.0	118.72		35.616	83.104 118.720
Costo total de resultado						141.182	305.262 446.445
Costo unitario de resultado						0.141	0.305 0.446

LABEX							
Ficha de costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (Frasco)		Resultado		# Ficha	
ETAPA: Producto terminado		1000		ior Hemo-CIM SC anti-B		10	
Materias Primas y Materiales	U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
	M		CUC	MN	CUC	MN	
Estuche	u	1000	0.080400	0.069600	80.400	69.600	150.000
Literatura Interior	u	1000	0.039300	0.063100	39.300	63.100	102.400
Etiquetas	u	1250	0.044900	0.010700	56.125	13.375	69.500
ior Hemo-CIM SC anti-B	frasco	1000	0.141182	0.305262	141.182	305.262	446.445
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales			0.30578	0.4487	175.8250	146.1	768.3
SALARIO DIRECTO			SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE	
CATEGORIA OCUPAC. Y ESCALA			ESCALA	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN
Especialista Pricipal (+0,9)			635.00	3.3315845	8	0.00	26.65
Especialista III en II+D (+0,9)			575.00	3.0167891	8	0.00	24.13
Técnico Innovador I Nivel (+0,9)			535.00	2.8069255	8	0.00	22.46
Técnico Innovador II Nivel (+0,9)			515.00	2.7019937	8	0.00	21.62
Técnico de produccion (+0,9)			495.00	2.5970619	8	0.00	20.78
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(+0,9)			395.00	2.0724029	8	0.00	16.58
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(+0,9)			395.00	2.0724029	8	0.00	16.58
Sub - Total					56	0.00	148.79
Vacaciones Acum.9.09%							13.53
Sub - Total							162.32
Seguridad Social 12,5%							20.29
Total						0.00	182.61
Costo Indirecto Aplicado		Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE	
					CUC 30%	CUC 30%	MN UM
Coeficiente Aplicado		2.1200	56.0	118.720		35.6160	83.1040 118.7200
Costo total de resultado						211.4410	411.7874 623.2284
Costo unitario de resultado						0.2114	0.4118 0.6232

Anexo 18. Ficha de costo de la propuesta de producción de sobrenadante anti-B empleando el medio de cultivo DMEM/F-12 + Cell Boost 5.

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (mL)		Resultado		# Ficha	
Etapa: Preparación de medios y soluciones		10000		Medio DMEM/F-12 + cell bost		6	
Materias Primas y Materiales	U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
	M		CUC	MN	CUC	MN	
DMEM/F-12	g	120	0.505138	0.077062	60.617	9.247	69.864
Hepes	g	43	0.857436	0.040916	36.870	1.759	38.629
Bicarbonato de Sodio	g	20	0.017160	0.000728	0.343	0.015	0.358
L-glutamina	g	3	0.000000	0.002000	0.000	0.006	0.006
Piruvato de Sodio	g	1.1	1.501773	0.216047	1.652	0.238	1.890
Agua Purificada	ml	9190	0.000000	0.000040	0.000	0.368	0.368
cell boster 5	g	30	2.000000	0.080300	60.000	2.409	62.409
2-Mercaptoetanol al 0,5%	ml	10	0.035535	0.204050	0.355	2.041	2.396
Etanol 70°	ml	300	0.003644	0.021024	1.093	6.307	7.400
Frasco roller de 850cm ²	U	5	0.523583	0.000000	2.618	0.000	2.618
Filtro capsula Sartobran 300	U	1	426.207660	0.000000	426.208	0.000	426.208
Punta azul	U	3	0.045523	0.007518	0.137	0.023	0.159
Torunda	U	3	0.002024	0.002861	0.006	0.009	0.015
Guantes estériles sin talco	par	2	0.366642	0.049950	0.733	0.100	0.833
TOTAL			4.9207	0.6422	590.6315	22.5204	613.1519
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		SALARIO ESCALA	TARIFA HORARIA	Horas TRABAJ.	Importe		
					CUC	MN	
Especialista III en IID (+0,9)		575.00	3.016789	4.0	0.0000	12.067	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.806925	4.0	0.0000	11.228	
						0.000	
						0.000	
						0.000	
						0.000	
Sub-Total			18.51	8.0	0.0000	23.295	
Acumulación de Vacaciones 9.09%						2.118	
Sub-Total						25.412	
Contrib. A la Seg. Social 12.5%						3.177	
TOTAL				8.0	0.0000	28.589	
Costo Indirecto Aplicado		Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice CUC 30%	IMPORTE CUC 30% MN	TOTAL UM
Coeficiente Aplicado		2.12	8.00	16.96		5.088 11.872	16.960
Costo total de resultado						595.719 62.981	658.701
Costo unitario de resultado (mL)						0.060 0.006	0.066

Producción de sobrenadante anti-B en un medio de cultivo alternativo
Anexos

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (ml)	Resultado		# Ficha		
Etapa: Producción de sobrenadante		33000	Sobrenadante anti -B		7		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
			CUC	MN	CUC	MN	UM
Medio DMEM+SFB	mL	33000	0.05957	0.00630	1,965.874	207.838	2,173.713
Tripán azul al 0,4%	mL	10	0.09540	0.31941	0.954	3.194	4.148
Etanol 70º	mL	7000	0.00364	0.02102	25.507	147.168	172.676
Banco de trabajo anti-B	criovial	1	3.14218	11.15496	3.142	11.155	14.297
Placa de 24 pozos	U	1	0.04154	0.00028	0.042	0.000	0.042
Pipeta Serológica de 5 mL	U	80	0.60268	0.00000	48.214	0.000	48.214
Pipeta Serológica de 10 mL	U	20	0.70564	0.05210	14.113	1.042	15.155
Pipeta Serológica de 25 mL	U	20	0.38774	0.04724	7.755	0.945	8.700
Pipeta Serológica de 50 mL	U	15	0.49975	0.03325	7.496	0.499	7.995
Frasco de cultivo de 25 cm ²	U	3	0.69560	0.01570	2.087	0.047	2.134
Frasco de cultivo de 75 cm ²	U	4	1.32618	0.13129	5.305	0.525	5.830
Frasco de cultivo de 175 cm ²	U	6	2.15178	0.10900	12.911	0.654	13.565
Frasco roller de 850cm ²	U	12	4.69290	0.18340	56.315	2.201	58.516
Tubo de centrifuga de 50 mL	U	2	0.11230	0.00000	0.225	0.000	0.225
Tubo de centrifuga de 175 mL	U	10	0.00000	0.00050	0.000	0.005	0.005
Vial de 1,5 mL	U	50	0.00470	0.00860	0.235	0.430	0.665
Punta amarilla	U	30	0.03848	0.00322	1.154	0.096	1.251
Torunda	U	100	0.00202	0.00286	0.202	0.286	0.489
Guantes estériles	Par	25	0.36664	0.04995	9.166	1.249	10.415
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales					194.823	169.496	2,538.032
SALARIO DIRECTO		SALARIO ESCALA	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	
Especialista Principal (+0.9)		635.00	3.33158447	720	0	2398.741	
Especialista III en IID (+0.9)		575.00	3.01678909	720	0	2172.088	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0.9)		535.00	2.80692550	720	0	2020.986	
Sub - Total				2160.0	0.0	6591.815	
Vacaciones Acum.9.09%						599.196	
Sub - Total						7191.011	
Seguridad Social 12,5%						898.876	
Total				2160.0	0.00	8089.888	
Costo Indirecto Aplicado	Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE		Total
				CUC 30%	CUC 30%	MN	UM
Coeficiente Aplicado	2.12	2160.0	4579.2000		1373.760	3205.440	4579.200
Costo total de resultado					1568.583	11464.824	13033.407
Costo unitario de resultado					0.048	0.347	0.395

LABEX							
Fichas de Costo	Departamento: Producción						
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (ml)	Resultado		# Ficha		
Etapas: Formulación		10000	Formulado anti - B		8		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
			CUC	MN	CUC	MN	UM
Albumina Sérica Bovina 30 %	mL	667	0.00000	1.42314	0.000	948.758	948.758
Cloruro de Sodio	g	40	0.00695	0.00136	0.278	0.054	0.332
Cloruro de Potasio	g	1	1.20998	0.00155	1.210	0.002	1.212
Dihidrógeno Fosfato de Potasio	g	1	0.00000	0.21041	0.000	0.210	0.210
Hidrógeno Fosfato disódico	g	5.8	0.00000	0.20410	0.000	1.184	1.184
Acida Sódica	g	10	0.00000	0.20143	0.000	2.014	2.014
Acriflavina	g	0.05	0.00000	1.48265	0.000	0.074	0.074
Guantes	par	4	0.36664	0.04995	1.467	0.200	1.666
Membranade 0,2µm (Ø142mm)	u	1	2.89020	0.11560	2.890	0.116	3.006
Membrana de 0,45µm (Ø142mm)	u	1	4.62970	0.00000	4.630	0.000	4.630
Membrana Prefiltro 50µm (Ø130mm)	u	1	1.41000	0.00000	1.410	0.000	1.410
Sobrenadante anti-B	mL	9333	0.04753	0.34742	443.640	3,242.577	3,686.216
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales			10.513	3.690	11.885	952.612	964.497
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPAC.Y ESCALA		ESCALA	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	
Especialista Principal (+0.9)		635.00	3.3315845	8.0		26.65	
Especialista III en II+D		575.00	3.0167891	8.0		24.13	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.8069255	8.0		22.46	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		535.00	2.8069255	8.0		22.46	
Sub - Total				32.0	0.0	95.70	
Vacaciones Acum.9.09%						8.70	
Sub - Total						104.40	
Seguridad Social 12,5%						13.05	
Total				32.0	0.00	117.45	
Costo Indirecto Aplicado	Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE		Total
				CUC 30%	CUC 30%	MN	UM
Coficiente Aplicado	2.12	32.00	67.84		20.352	47.488	67.840
Costo total de resultado					32.237	1117.547	1149.783
Costo unitario de resultado					0.003	0.112	0.115

Producción de sobrenadante anti-B en un medio de cultivo alternativo
Anexos

LABEX							
Fichas de Costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (Frasco)		Resultado		# Ficha	
Etapa: Llenado		1000		Llenado Sobrenadante anti-B		9	
Materias Primas y Materiales	U M	Cantid.	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
			CUC	MN	CUC	MN	
Guantes	par	7	0.366642	0.049950	2.566	0.350	2.916
Frascos de vidrio GL-18	u	1000	0.096700	0.002000	96.700	2.000	98.700
Conjuntos cueta gotas	u	1000	0.006300	0.037200	6.300	37.200	43.500
Formulado anti-B	mL	5500	0.003224	0.111755	17.730	614.651	632.381
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales			0.4729	0.20090	105.5665	39.5497	145.116
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPAC. Y ESCALA		ESCALA	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	
Especialista Principal (+0,9)		635.00	3.33158447	8	0	26.653	
Especialista III en II+D		575.00	3.01678909	8	0	24.134	
Técnico Innovador I Nivel (0,9)		535.00	2.80692550	8	0	22.455	
Técnico Innovador II Nivel (0,9)		515.00	2.70199370	8	0	21.616	
Técnico de producción (0,9)		495.00	2.59706191	8	0	20.776	
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(0,9)		395.00	2.07240294	8	0	16.579	
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(0,9)		395.00	2.07240294	8	0	16.579	
Sub - Total				56	0.0	148.793	
Vacaciones Acum.9.09%						13.525	
Sub - Total						162.319	
Seguridad Social 12,5%						20.290	
Total				56.0	0.00	182.608	
Costo Indirecto Aplicado	Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE		Total
				CUC 30%	CUC 30%	MN	UM
Coeficiente Aplicado	2.12	56.0	118.72		35.616	83.104	118.720
Costo total de resultado					141.182	305.262	446.445
Costo unitario de resultado					0.141	0.305	0.446

LABEX							
Ficha de costo		Departamento: Producción					
Producto: Hemoclasificador anti-B		Cantidad (Frasco)		Resultado		# Ficha	
ETAPA: Producto terminado		1000		ior Hemo-CIM SC anti-B		10	
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		TOTAL
			CUC	MN	CUC	MN	
Estuche	u	1000	0.080400	0.069600	80.400	69.600	150.000
Literatura Interior	u	1000	0.039300	0.063100	39.300	63.100	102.400
Etiquetas	u	1250	0.044900	0.010700	56.125	13.375	69.500
ior Hemo-CIM SC anti-B	frasco	1000	0.141182	0.305262	141.182	305.262	446.445
Sub-Total Mat. Prima y Mat. Fdtales			0.30578	0.4487	175.8250	146.1	768.3
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPAC. Y ESCALA		ESCALA	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	
Especialista Prcipal (+0,9)		635.00	3.3315845	8	0.00	26.65	
Especialista III en II+D (+0,9)		575.00	3.0167891	8	0.00	24.13	
Técnico Innovador I Nivel (+0,9)		535.00	2.8069255	8	0.00	22.46	
Técnico Innovador II Nivel (+0,9)		515.00	2.7019937	8	0.00	21.62	
Técnico de producción (+0,9)		495.00	2.5970619	8	0.00	20.78	
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(+0,9)		395.00	2.0724029	8	0.00	16.58	
Aux. oper. prep. y elabor. Medic.(+0,9)		395.00	2.0724029	8	0.00	16.58	
Sub - Total				56	0.00	148.79	
Vacaciones Acum.9.09%						13.53	
Sub - Total						162.32	
Seguridad Social 12,5%						20.29	
Total					0.00	182.61	
Costo Indirecto Aplicado	Cuota Aplicada	Hrs M.O.D.	Importe	Indice	IMPORTE		Total
				CUC 30%	CUC 30%	MN	UM
Coeficiente Aplicado	2.1200	56.0	118.720		35.6160	83.1040	118.7200
Costo total de resultado					211.4410	411.7874	623.2284
Costo unitario de resultado					0.2114	0.4118	0.6232