
7. CONCLUSIONS.

7. CONCLUSIONS.

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball s'han pogut extreure les següents conclusions finals.

- S'ha demostrat la validesa de les mesures de concentració cel·lular provades, com els mètodes òptics i les mesures d'espectroscòpia d'impedància i s'ha detectat en quina situació del cultiu és més apropiada cadascuna d'elles. D'altra banda, s'ha implementat d'una forma simple la mesura de la demanda d'oxigen, obtenint-se així informació en línia sobre l'estat del cultiu. A més a més, gràcies al desenvolupament del programari de control es disposa d'una eina molt versàtil i robusta per implementar futurs tipus de bioprocessos.
- A partir de l'estudi de les principals estratègies de cultiu, es pot concloure que els sistemes de cultiu en perfusió són l'alternativa més aconsellable a l'hora d'obtenir altes densitats cel·lulars i productivitats més elevades per a les cèl·lules de l'hibridoma KB-26.5, ja que permeten reproduir millor les condicions en què les cèl·lules es troben *in vivo*, és a dir, se subministren contínuament els nutrients necessaris, s'eliminen els subproductes tòxics del cultiu i es recupera el producte d'interès, tot mantenint les cèl·lules dins del bioreactor. Aquest fet s'ha pogut comprovar al sistema posat a punt en aquest treball, un bioreactor de tanc agitat amb un mòdul de microfiltració extern per a la retenció cel·lular.
- Tot i les avantatges dels sistemes de cultiu en perfusió, la seva aplicació comporta també una sèrie d'inconvenients com és una major complexitat del procés. Per tant, per d'altres línies de cèl·lules animals, diferents a l'hibridoma KB-26.5, no s'ha de descartar l'estratègia en *fed-batch* aquí mostrada, ja que la seva operació més simple pot ser molt valuosa. En d'altres casos, el manteniment de la glucosa i la glutamina a baixos nivells de concentració pot ser un bon plantejament per controlar el metabolisme cel·lular en els cultius en *fed-batch*, i així perllongar la vida del cultiu i augmentar la producció del producte d'interès. De la mateixa forma, s'haurien de comprovar la validesa dels esquemes de control proposats en aquest treball pels altres cultius cel·lulars.
- La limitació de nutrients observada en els cultius en perfusió, d'igual manera al que succeeix en els cultius en discontinu, condueix a la mort de les cèl·lules. L'aparició d'aquesta limitació és independent del sistema de cultiu emprat, arriba més tard en els cultius en perfusió, però també s'acaba donant com a conseqüència de la manca de control que es té sobre el cicle cel·lular. Una possibilitat per minimitzar aquest problema, que seria molt interessant d'explorar en el futur, és la d'introduir algun mecanisme per

controlar la progressió del cicle cel·lular. El concepte consisteix en obtenir unes cèl·lules en un estat citoestàtic, que majoritàriament s'acumulessin a la fase G1 del seu cicle cel·lular, i mantinguessin la seva capacitat productiva. Com a treball futur caldria explorar si aquest control es pot realitzar amb una reducció o supressió d'algun component clau del medi d'alimentació. D'algunes observacions preliminars es desprèn que aquest efecte es podria aconseguir mitjançant una disminució més gran del contingut en sèrum, o bé amb una reducció de la quantitat de fosfats en el medi d'alimentació. També és possible explotar, amb aquesta mateixa finalitat, la potencialitat de l'enginyeria metabòlica, intentant desenvolupar cèl·lules que incorporen aquesta capacitat de regulació del cicle cel·lular i protecció de l'apoptosi.

- Tot i els bons resultats obtinguts en l'estratègia en perfusió, s'han de millorar certs aspectes de la configuració operacional. Entre d'altres, s'ha d'implementar una nova disposició del sistema d'aeració, amb més capacitat per suportar elevades densitats cel·lulars. Un altre aspecte a considerar és el disseny balancejat de medis d'alimentació concentrats, que permetin un millor aprofitament dels recursos nutricionals i un entorn de creixement més bo. També és necessari la caracterització precisa del comportament cel·lular en aquests medis per definir un esquema de control adient per al nou sistema de perfusió. A més, la incorporació de noves mesures a l'esquema de control de nutrients, com les mesures d'espectroscòpia d'impedància, poden ser molt importants per complementar la informació relativa a la concentració cel·lular. Aquesta rellevància del mètode d'espectroscòpia d'impedància es deu a la propietat que té per mesurar les cèl·lules viables, que en segons quins moments del procés (fase de producció) podria arribar a substituir a les mesures turbidimètriques, sobretot si es té en compte que els nivells cel·lulars assolits en aquest cas, fan que la principal limitació associada a aquesta mesura, és a dir, la de tenir un límit de detecció massa baix, ja no seria cap factor limitant.

8. MATERIALS I MÈTODES.

8. MATERIALS I MÈTODES.

8.1. EQUIPS DE CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS.

8.1.1. Flascons de cultiu.

Els flascons de cultiu (Nunc, T-flask 136196 i 178891), que se subministren estèrils, són de poliestirè. S'utilitzen dos models diferents: els de 25 cm² per cultivar volums de fins a 10 ml i els de 260 cm² per a volums de fins a 50 ml de medi. La presència d'un filtre de 0.22 µm de diàmetre de porus en el tap dels flascons facilita l'intercanvi de gasos amb l'exterior i permet el control del pH quan el flascó es troba a l'incubador de CO₂, mantenint al mateix temps l'esterilitat.

En aquests flascons s'han portat a terme experiments preliminars a petita escala amb cèl·lules en suspensió i les ressembres de la línia cel·lular, a partir de què es preparen els inòculs per als diferents experiments.

8.1.2. Flascons de cultiu agitats.

Els flascons de cultiu agitats (Techne, Spinner flasks) són uns recipients de vidre destinats al cultiu cel·lular que assegurin una constant agitació del medi, mitjançant la presència en el seu interior d'una vareta, també de vidre, unida a la base del tap i amb un imant inclòs a la punta. Al col·locar-los sobre una placa d'agitació magnètica de velocitat regulable (Techne, MCS-104S, amb capacitat per a 4 flascons), el pèndol proporciona una agitació suau en sentit circular del medi de cultiu que assegura una homogeneïtzació constant de la suspensió cel·lular, generant un esforç de cisallament (*shear stress*) mínim per a les cèl·lules. L'agitació emprada en tots els experiments és de 40 rpm. Els flascons també disposen a la seva part superior de dues obertures laterals destinades a la presa de mostres i l'intercanvi de gasos.

Aquests flascons s'utilitzen per fer créixer cultius amb uns volums de 125 ml (ref. F-7987), 250 ml (ref. F-7690) o 500 ml (ref. F-7609) de medi.

Els dos equips de cultiu descrits anteriorment operen en un incubador (Forma Scientifics, Incubador IR amb filtre HEPA, model 3862) a 37 °C, en una atmosfera saturada d'humitat (95%) per evitar l'evaporació del medi, i a un 5% de CO₂ per controlar el pH en medis amb tampó bicarbonat.

8.1.3. Bioreactor Biostat MCD.



Figura 8.1. Equip de cultiu Biostat MCD de Braun Biotech.

El bioreactor utilitzat és el Biostat MCD de Braun Biotech (Figura 8.1). El recipient de cultiu és de vidre (borosilicat) amb una relació alçada/diàmetre de 2:1. El volum màxim de treball és de 2 litres, d'un volum total de 2.5 litres. Les juntes tòriques estan fabricades en elastòmer etilènic-propilènic (EPDM) i totes les parts en contacte amb el medi en acer inoxidable (1.457), incloent la tapa superior. Aquesta última disposa de 7 entrades de 19 mm de diàmetre i 10 entrades de 6 mm. En ella es poden instal·lar la presa de mostra manual, el sistema de bombolleig, el condensador de la sortida de gasos, els diferents sensors, boques injectores, entrada i sortida de gasos, etc.

La unitat de mesura i control digital (DCU) ofereix totes les funcions necessàries per a l'automatització del sistema, pel que fa a les variables bàsiques: temperatura, pH i oxigen dissolt (pO_2). Aquestes funcions són l'adquisició de dades, calibratge dels sensors i gestió dels anells de control. A més a més, la DCU pot ser integrada en un sistema d'automatització jeràrquic via port sèrie RS-422-A, per així poder modificar o consignar amb un ordinador de gestió els paràmetres de control del procés, com es fa en aquest treball. La DCU està basada en el microprocessador de 16 bits 68010 (Motorola) i el software treballa en el sistema operatiu industrial OS-9 (Microware). El sistema operatiu i el programa aplicació disposa d'un màxim de memòria EPROM (memòria només de lectura reprogramable) de 512 Kbits.

La transferència dels compostos aire, N_2 , O_2 , i CO_2 des de la fase gas, es fan mitjançant un tub de silicona per evitar el bombolleig directe, i amb una estació de mescla de gasos, on es barregen de forma diferent per controlar el pH i el pO_2 . A continuació, es descriuen breument els anells de control, continguts en la DCU, de les variables més importants del procés:

- **Control de temperatura:** La temperatura es controla mitjançant un control en cascada amb un master-controlador per a la temperatura del recipient de cultiu (controlador TEMP) i un servo-controlador per a la temperatura de la camisa de termostatització del recipient (controlador JTEMP). L'element escalfant és una resistència elèctrica i el refrigerant aigua de xarxa. La mesura es realitza amb una PT-100 (Figura 8.2) i el mòdul de control és un PID.

- Control d'agitació: La velocitat d'agitació es regula a través d'un control de motor extern. La funció control de la velocitat d'agitació del sistema de la DCU treballa com un controlador de consigna. En el bioreactor la mescla s'efectua per un agitador amb tres discos de 2 grans pales d'hèlix marina inclinades a 45° i situades equidistants sobre l'eix.
- Control de pH: En les dues estacions de mescla de gasos disponibles (que es descriuen al proper apartat), el control de pH per l'agent corrector àcid es fa amb el gas CO₂ (i no amb la bomba d'àcid) i la vàlvula solenoide. La bomba correctora d'àlcali i la vàlvula es controlen mitjançant dues sortides de pols ample modulad (pwm) en operació de rang dividit. Això permet que els dos elements puguin ser controlats simultàniament. L'element de mesura és un elèctrode de vidre i un elèctrode de referència Ag/AgCl (405-DPAS-SC-K8S/200, Mettler Toledo) esterilitzable (Figura 8.2). El mòdul de control és un PI amb banda morta.



Figura 8.2. Elements de mesura del Biostat MCD. Començant per dalt: sensor de nivell #1, sensor de nivell #2, sonda de pH, sensor de temperatura i sonda de pO₂.

- Control d'oxigen dissolt: El mesurador de pO₂ és un elèctrode d'oxigen polarogràfic (32-591-3002, Ingold) esterilitzable (Figura 8.2). Es disposa de dos estacions de mescla de gasos, una per a cada equip Biostat MCD, que controlen el pO₂ de forma diferent.
 - ✓ Controlador *pO₂ Gas-Mix*: Aquesta funció de control fa funcionar directament les vàlvules d'aire i nitrogen mitjançant dues sortides pwm en operació de rang dividit. El mòdul de control sintonitzat per a la membrana tubular de silicona és un P amb banda morta i els paràmetres del controlador són: DEADB = 0.5% i XP = 4%.
 - ✓ Controlador *pO₂ Gas-Flow Ratio*: El pO₂ també es pot controlat mitjançant la mescla contínua de dos gasos per medi de dos cabalímetres màssics externs que milloren

substancialment la qualitat del control. Aquesta estació de gasos de la DCU realitza el control de la mescla mitjançant un control en cascada amb el controlador pO_2 *Gas-Flow Ratio* com a master-controlador i el controlador *Gas-Flow Ratio* com a servo-controlador. El controlador *Gas-Flow Ratio* controla la relació d'entrada de la mescla de gasos (Aire/N₂) i en aquest treball s'utilitza com a control del flux el gas total (TOTAL). El mòdul de control sintonitzat per a la membrana tubular de silicona (Figura 8.3) és un P amb banda morta i els paràmetres del controlador són: DEADB = 0.5% i XP = 1%. Per al microdifusor de bombolles (Figura 8.3) és un PI amb banda morta i els paràmetres del controlador són: DEADB = 0.5%, XP = 90% i TI = 50 s.

- **Control de nivell:** L'augment/disminució de nivell en el recipient de cultiu es preveu amb la funció control d'escuma (FOAM) i el sensor basat en el principi de conductivitat (Figura 8.2). Quan el líquid entra en contacte amb el sensor de nivell es tanca el circuit i envia un senyal digital a la funció control FOAM. Aleshores, durant un temps fixat per l'usuari, la bomba d'extracció de medi s'acciona. El controlador funciona com un *On/Off* amb temporització.

8.2. INSTRUMENTACIÓ I EQUIPAMENT ASSOCIAT AL BIOREACTOR.

8.2.1. Sistemes de bombolleig.

Es disposen de tres sistemes difusors per a bombolles d'aire en els cultius cel·lulars (Figura 8.3):



Figura 8.3. Diferents sistemes de bombolleig. D'esquerra a dreta es mostren el difusor d'anell perforat, la membrana tubular de silicona i el microdifusor.

- Difusor d'anell perforat: Barra d'acer inoxidable amb un anell en forma d'O al seu extrem final amb 14 orificis distribuïts uniformement de 0.5 mm de diàmetre que produeix bombolles grans. Està situat 15 mm sota l'agitador.
- Membrana tubular de silicona: L'oxigenació per membrana tubular de silicona consta d'un cistell d'acer inoxidable envoltat per 6.3 m de tub de silicona de 3 mm de diàmetre i paret interna de 0.35 mm de gruix que no produeix bombolles en el medi de cultiu donat que l'oxigen es transporta per difusió cap al líquid del bioreactor. Està instal·lat al voltant de l'agitador i necessita una pressió de 0.5 bars a la sortida per facilitar la difusió a través seu.
- Microdifusor: Barra d'acer inoxidable amb un cilindre d'acer sinteritzat a l'extrem amb nombrosos porus amb diàmetres en el rang de 10 a 20 μm . Aquest s'utilitza per produir microbombolles i està situat 10 mm sota l'agitador.

Després de cada experiment o cultiu els difusors són netejats a fons utilitzant detergent sense fosfats i aigua de qualitat Milli Q.

8.2.2. Mòdul de microfiltració CellFlo.

El mòdul de Microgon CellFlo (C22 M011 01N) està dissenyat per separar cèl·lules animals del medi exhaurit del cultiu (Figura 8.4). Aquests mòduls utilitzen un feix de fibres buides de gran diàmetre de porus per minimitzar l'obturalment degut a l'aglomeració cel·lular. Els mòduls CellFlo poden ser esterilitzats a l'autoclau, a 121 °C durant 30 minuts.



Especificacions tècniques:

- Connexions entrada/sortida: 6 mm *hose barb*
- Connexions laterals: *Female Luer Lock*
- Nombre de fibres buides: 120
- Material de membrana: mescla d'esters (ME)
- Diàmetre intern de la fibra: 1.0 mm
- Àrea superficial: 725 cm²
- Grandària de porus: 0.2 μm

Figura 8.4. Mòdul de microfiltració CellFlo.

8.2.3. Sonda Aquasant AF44 CS/R.

Aquest element permet tenir una lectura de la terbolesa del medi en què es troba. El sensor disposa de fibres òptiques que mesuren la llum refractada a la banda de l'infraroig (940 nm). El sensor està fabricat en acer inoxidable (1.4435) i amb dimensions de 19 mm de diàmetre i 200 mm de llargada (Figura 8.5). És esterilitzable a l'autoclau, podent treballar a màxims de temperatura i pressió de 120 °C i 3 bars respectivament.



Figura 8.5. Sonda Aquasant AF44 CS/R amb peça adaptadora a la tapa del Biostat MCD.

8.2.4. Turbidímetre Aquasant AS82.

El turbidímetre Aquasant AS82 és un transmissor que mostra la resposta de la sonda Aquasant AF 44 CS/R. Aquest transmissor disposa d'elements per poder compensar el senyal 0-20 segons (*Integration time*), així com l'ajust del senyal a zero (*Compensation*) - p. ex. degut al soroll provocat per bombolles d'aire - afinar la sensibilitat del senyal, o bé canviar el guany augmentant o disminuint el rang de mesura (30/10/3/1). La sortida del senyal, que en la pantalla té un rang de 0-100 %, correspon a 4-20 mA.

8.2.5. Electrovàlvula de 3-vies Sirai.

Les electrovàlvules utilitzades per controlar el flux de gasos com l'aire, el N₂ i el O₂ són de 3-vies (D344V57-Z530A Sirai). El cos de la vàlvula i la junta d'estanqueïtat estan fabricats en elastòmer fluorocarbònic (FPM) i en polieterimida (PEI) respectivament. Poden treballar a temperatures i pressions de fins a 100 °C i 1.5 bars respectivament. El coeficient Kv per aquesta electrovàlvula és de 0.28. La bovina treballa a voltatge estàndard de 12 V a corrent continu i consumeix 6 W.

8.2.6. Unitats de bombeig.

S'han utilitzat diversos tipus de bombes. Totes les bombes poden ser utilitzades per bombejar en condicions estèrils quan s'utilitza tub esterilitzable. A continuació, es descriuen breument algunes de les seves característiques:

- Bomba Braun FE-211: Bomba de membrana dosificadora, de velocitat variable i no reversible que disposa de diferents capçals esterilitzables en acer inoxidable (1.4571). Aquests poden ser de dos tipus: F0.1 (rang de cabals 0.1-9.9 ml/min, error de dosificació inferior $\pm 5\%$) i F1 (rang de cabals 1-99 ml/min, error de dosificació inferior $\pm 2\%$). La bomba es connecta a la DCU del fermentador Braun MD per obtenir un control remot sobre ella. També pot operar manualment.
- Bomba Ismatec REGLO-Analogue MS-4/8-100: Bomba peristàltica de 4 canals de velocitat variable i reversible, que permet treballar en un ampli rang de baixos cabals, depenent del diàmetre intern del tub-capçal (rang de velocitat del motor: 2-100 rpm). Pot operar manualment, o bé, remotament a través d'una interfície analògica de 0-5 V, 0-10 V, 0-20 mA o 4-20 mA.
- Bomba Biostat MCD (Matson Warlow): Bomba peristàltica de velocitat fixa i no reversible. Aquesta pot treballar com agent actuador en els anells de control d'escuma i pH de la DCU. Amb l'actuació remota a través del port sèrie RS-422-A la bomba assignada al control d'escuma es pot comandar per altres tasques. Se simula que el sensor d'escuma està actiu: *MANUAL OPERATION/DIGITAL INPUTS/FOAM: Man On*, i mitjançant el controlador d'escuma es pot fer servir aquesta bomba en mode *On/Off (CONTROL LOOPS/FOAM/MODE: Auto || Off)*.
- Bomba Masterflex L/S 7521-45: La bomba peristàltica Masterflex (Cole Palmer) de velocitat variable i reversible permet operar amb 4 capçals diferents que cobreixen un ampli rang de cabals. El rang de velocitat del motor va des de 6 fins a 600 rpm. S'ha treballat amb el capçal Easy-Load 7518-00 (Cole Palmer). El control remot de la velocitat és de 4-20 mA i el de l'aturada és de 5-20 V o bé 4-20 mA.

8.2.7. Fonts suplementàries d'energia.

- BlackoutBuster B10E PKElectronics: Sistema d'alimentació ininterrompuda (SAI) amb una sortida de 500 VA (200 W) que protegeix els equips més importants del procés d'un possible tall del subministrament elèctric sense riscos de perdre la continuïtat dels seus senyals. En aquest mòdul principal hi ha connectat un altre en sèrie, anomenat B10PE

Power Pack, que augmenta la potència de sortida fins a 1000 VA (400 W). Aquest conjunt dóna servei a l'ordinador que gestiona el procés així com a la font d'alimentació, el turbidímetre Aquasant AS82 i la bomba dosificadora de Braun FE-211.

- Ffreak M10-330A-03: Font d'alimentació que disposa d'un voltatge de 13.8 V i una intensitat de 3 A (en total pot suportar fins a 40 W). Dóna servei a la caixa de comunicacions, concretament als commutadors (relés) de les electrovàlvules Sirai.
- Grup electrogen AUT-6000 H/FR: La seva funció és aconseguir la mínima distorsió en el subministrament del corrent elèctric, posant-se en marxa automàticament en cas de fallada del servei elèctric de la companyia. En aquest sistema es connecten l'equip Biostat MCD, les bombes, l'ordinador i els senyals analògics entre d'altres equips del laboratori.

8.3. EQUIPAMENT PER A LA GESTIÓ DE LA INSTRUMENTACIÓ I L'ADQUISICIÓ DE DADES.

Un cop s'han descrit els equips i la instrumentació necessària a l'entorn del reactor per tal de conèixer les condicions ambientals del cultiu, cal interpretar i centralitzar les mesures per poder actuar sobre el procés. La informació recollida ha d'enviar-se a un sistema de gestió que permeti recopilar totes les dades i emprendre les conseqüents accions de control. Normalment, s'utilitza per a tal fi un ordinador que permet, entre d'altres funcions, la comunicació amb tots els sensors i equips. Aquests envien un senyal de tipus elèctric proporcional al valor de la variable que es mesura.

Per a la transmissió de dades entre dos equips de control es poden emprar diferents tipus de senyals, classificables en dos grans grups: la transmissió analògica i la digital. La diferència bàsica entre aquests dos tipus de transmissió resta en la forma de transmetre el senyal. Si és analògic, indica que el senyal és totalment continu, pel contrari, el digital envia dades discontinuament. Per a la comunicació de dades digitals en sèrie s'han establert diferents protocols que especifiquen les característiques tècniques de la connexió. En aquest treball s'han utilitzat el protocol de comunicació RS-422-A per a les transmissions de dades des de la DCU a l'ordinador i un targeta per convertir el senyal analògic a digital i el digital a analògic.

La construcció i implementació del programa d'adquisició de dades i gestió de la diferent instrumentació, descrit al capítol 5 de la memòria, no ha estat possible sense els components que s'especifiquen a continuació; donant una breu descripció de les característiques tècniques de cadascun d'ells.

8.3.1. Ordinador de gestió.

Les funcions de l'ordinador són el control, monitoratge i supervisió del cultiu cel·lular. Amb aquesta eina s'ha desenvolupat el software de gestió dels diferents processos. Sota el sistema operatiu Windows95 s'executen els programes utilitzats i aplicacions realitzades en aquest treball.

Especificacions tècniques:

- 64 Mb de memòria d'accés aleatori (RAM).
- PC Pentium II a 266MHZ.
- 4 Gb de memòria en unitat de disc dur.
- Lector de CD-ROM 40x i disquetera de 3 .

8.3.2. Targeta Advantech PCL-812-PG.

La targeta Advantech PCL-812-PG és una targeta d'adquisició de dades multifuncional d'alta resolució i velocitat que serveix per comunicar ordinadors compatibles amb IBM PC/XT/AT i els diferents aparells. S'ha utilitzat per a l'adquisició de dades i el control del procés.

Especificacions tècniques:

- La velocitat de mostreig màxima del convertidor A/D és de 30 kHz.
- 16 entrades analògiques amb convertidor A/D per aproximacions successives de 12 bits.
- 2 sortides analògiques amb convertidor D/A de 12 bits.
- 16 entrades i 16 sortides digitals, compatibles TTL/DTL.

8.3.3. Caixa de comunicacions i cablatge.

La caixa de comunicacions s'ha construït per suportar les connexions entre la targeta d'Advantech PCL-812-PG i els diferents aparells que s'han de controlar i obtenir dades (Figures 8.6.a i 8.6.b). Aquesta caixa s'ha dissenyat per tenir connexions robustes, sense riscos de curtcircuitatge o en cas d'accident, trencament de soldadures dels cables. En l'interior disposa d'una targeta de control de relés amb *driver* paral·lel (Figura 8.6.c) que conté 8 entrades TTL i 8 relés (per commutar les electrovàlvules) cadascun d'ells controlats per una línia TTL de la targeta d'Advantech PCL-812-PG (de fet només quatre) i està connectat a la font d'alimentació Ffreak M10-330A-03 per donar la potència necessària (6 W per a cada electrovàlvula).

Especificacions tècniques:

- 4 connexions per a senyals d'entrada analògics, p. ex. sensor d'Aquasant (Figura 8.6.b).
- 2 connectors de 15-clavilles (*pin*) per a bombes de velocitat variable (Figura 8.6.b).
- 2 connectors de 15-clavilles per a bombes de velocitat fixa (Start/Stop) (Figura 8.6.b).
- 8 connexions de commutació On/Off (Electrovàlvules) amb els diodes (Figura 8.6.b).
- 2 connectors de 40-clavilles, un del senyal analògic i l'altre del digital (Figura 8.6.a).
- 1 endoll per a la font d'alimentació Ffreak M10-330A-03 (Figura 8.6.a).

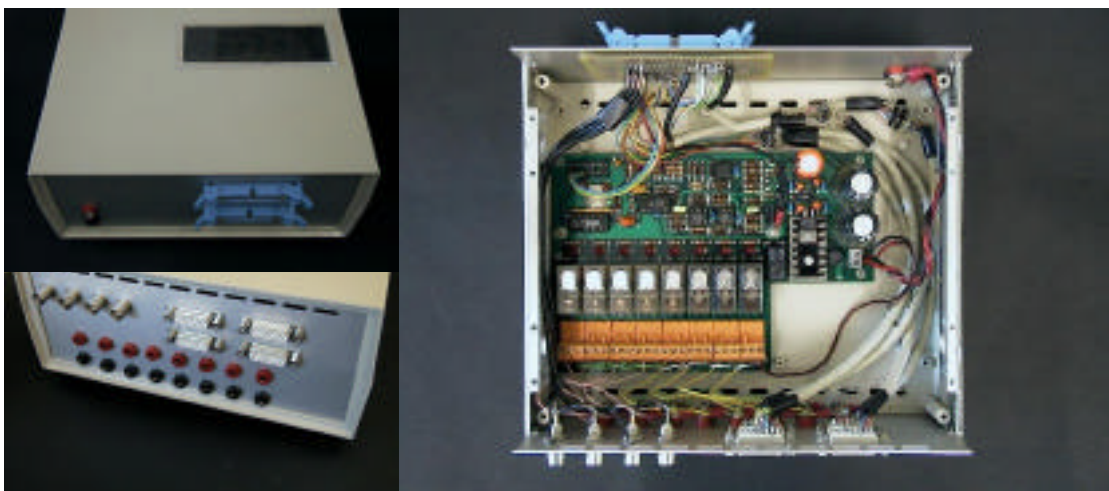


Figura 8.6. Detalls de la caixa de comunicacions: a) Imatge superior esquerra: part posterior de la caixa, b) Imatge inferior esquerra: part anterior de la caixa, c) Imatge dreta: vista interior.

També s'han construït 4 cables connectors de bombes (15-clavilles), 4 pels diferents sensors (cable apantallat), 2 de connexió PCL812PG Caixa (40-clavilles), 1 de connexió AC24AT DCU (9-clavilles) i 9 per a les connexions amb electrovàlvules i la font d'alimentació.

8.3.4. Targeta Opto22 AC24AT.

La placa AC24AT és un targeta adaptadora RS-422/485 que es connecta al bus ISA de dins del PC. Aquesta placa és vista per l'ordinador com un estàndard dels ports COM i subministra 4000 V AC d'aïllament entre el bus ISA i l'element a comunicar (DCU). La AC24AT també està protegida enfront a transitoris, senyals de control de flux configurables per RTS i CTS, i opera com *full duplex* amb velocitats de transmissió de fins 38000 bauds per a distàncies de fins a 1500 m, utilitzant dos parells de fils i un terra comú. Concretament, en aquest treball la placa s'ha configurat en el COM2 (2F8) a 9600 bauds.

A la Figura 8.7 es presenta l'esquema de la connexió elèctrica entre l'ordinador i la DCU. Aquesta comunicació es realitza mitjançant un cable apantallat de cinc fils per minimitzar el soroll que generen els equips elèctrics situats al voltant. També es necessiten

dues resistències terminals de 120 Ω (entre els dos fils de recepció i els dos de transmissió) per evitar els problemes que provocarien possibles sobrecàrregues en la línia.

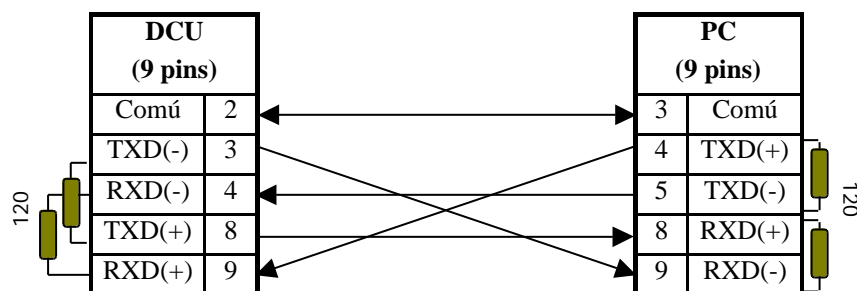


Figura 8.7. Esquema de connexió entre la DCU del Biostat MCD i l'ordinador.

8.4. LENGUATGES DE PROGRAMACIÓ.

8.4.1. Llenguatge ANSI C.

El llenguatge C el va inventar i implementar per primera vegada D. Ritchie sobre un DEC PDP-11 utilitzant el sistema operatiu UNIX. C és el resultat d'un procés de desenvolupament que va començar amb un llenguatge més antic anomenat PCPL, desenvolupat per M. Richards. PCPL va servir de base a un llenguatge anomenat B, que va inventar K. Thompson, i que va conduir al desenvolupament de C en els anys setanta.

Durant bastants anys, l'estàndard de C fou el que es descrivia a *The C Programming Language* escrit per B. Kernighan i D. Ritchie (1978). A l'expandir-se la utilització del llenguatge C, al 1983 es va organitzar un comitè per crear un estàndard, el ANSI C (*American National Standards Institute*). L'estàndard ANSI C es va adoptar finalment al 1989, i les primeres còpies per al públic en general varen estar disponibles en 1990. Avui en dia, pràcticament tots els compiladors s'adapten a l'estàndard, i la versió de C que s'utilitza en aquest treball en l'entorn LabWindows/CVI així ho fa.

Característiques tècniques:

Les construccions fonamentals de control de flux en els programes de C són les següents:

- Forma d'agrupació de les proposicions.
- Presa de decisions (if-else).
- Selecció d'un cas entre un conjunt (switch).
- Iteració amb condició d'aturada al principi (while, for) o al final (do).
- Acabament prematur de cicles (break).

Un dels avantatges principals de la programació en C es troba en la possibilitat de generar codis font de mida petita, basant-se en les especificacions següents:

- Poden fer-se ús extensiu de les crides a funcions, inclòs a crides recursives, d'una funció a si mateixa.
- El format per escriure codi font no és molt rígid.
- Es tracta d'un llenguatge estructurat.
- Pot programar-se a baix nivell.
- Té implementat l'ús de punters (direccionadors) per a memòria, funcions i estructures.

El llenguatge C s'ha convertit en un llenguatge molt utilitzat professionalment per diverses raons:

- Permet la utilització de molts tipus de variables, inclòs la definició de nous tipus.
- Té construccions de baix nivell.
- Pot utilitzar activitats a baix nivell.
- Permet construir programes eficients.
- El codi programat pot ser compilat en molts tipus d'ordinadors, genera codi portable.

El seu inconvenient més gran és que un error petit en la codificació pot fer que el programa no faci les coses que realment s'esperava d'ell. El compilador que transforma el codi font a executable, només comprova la correcció de la sintaxi de les instruccions, no si la seva execució pot provocar problemes o inestabilitat al sistema. Aquesta és la força i la feblesa del llenguatge C: permet treballar a baix nivell, el que incrementa la seva capacitat, però al mateix temps el torna vulnerable als errors de programació.

8.4.2. LabWindows/CVI.

El producte de National Instruments, LabWindows/CVI, és un entorn de desenvolupament de software per a programadors en llenguatge C. La versió utilitzada en aquest treball és LabWindows/CVI 3.0.1. Aquest es pot utilitzar per a les següents tasques:

- Desenvolupament interactiu de programes.
- Accedir a potents biblioteques de funcions per crear aplicacions per a l'adquisició de dades i pel control de la instrumentació.
- Presenta com avantatge un extens conjunt d'eines de programari per a l'adquisició, anàlisi i presentació de dades.

A l'entorn de desenvolupament LabWindows/CVI es pot editar, compilar, executar i depurar programes en llenguatge ANSI C. En aquest entorn, s'utilitzen les funcions de les biblioteques de funcions de LabWindows/CVI per escriure el programa desitjat. A més, cada funció té una interfície anomenada *function panel* on es pot executar la funció i generar codi

per cridar-la. Els programes escrits en l'entorn interactiu de LabWindows/CVI han de ser adherits a la especificació ANSI C. A més a més, quan es desenvolupen programes no hi ha problemes per utilitzar mòduls objecte compilats en C, biblioteques d'execució dinàmica (DLLs), biblioteques de C, i programes de control de la instrumentació (*drivers*) conjuntament amb els fitxers font de ANSI C.

La força de LabWindows/CVI radica en les seves biblioteques (Figura 8.8). Les biblioteques tenen funcions per desenvolupar totes les fases del sistema d'adquisició de dades i control de la instrumentació.

- Adquisició de Dades:
 - ✓ *Instrument Library*
 - ✓ *GPIB/GPIB 488.2 Library*
 - ✓ *Data Acquisition Library*
 - ✓ *Easy I/O for DAQ*
 - ✓ *RS-232 Library*
 - ✓ *VISA Library*
 - ✓ *VXI Library*
- Anàlisi de Dades:
 - ✓ *Formatting and I/O Library*
 - ✓ *Analysis Library*
 - ✓ *Advanced Analysis Library*
- Presentació de Dades:
 - ✓ *User Interface Library*
- Aplicacions a Xarxes i Comunicacions Interprocessals:
 - ✓ *Dynamic Data Exchange (DDE) Library*
 - ✓ *Transmission Control Protocol(TCP) Library*
 - ✓ *ActiveX Automation Library*
 - ✓ *DataSocket Library*



Figura 8.8. Aplicació **Sequen** en l'entorn LabWindows/CVI amb obertura del menú biblioteca.

A més a més, dins de l'entorn de desenvolupament de LabWindows/CVI es pot accedir a una completa biblioteca d'estàndard ANSI C.

8.5. LÍNIA CEL·LULAR.

La línia cel·lular emprada en aquest treball ha estat l'hibridoma KB-26.5, que prové de la fusió de cèl·lules de mieloma murines NS1 i limfòcits B murins Balb C. L'hibridoma KB-26.5 produeix una immunoglobulina del tipus IgG₃ contra l'antigen A₁ d'eritròcits. Aquest anticòs monoclonal s'utilitza en la determinació del grup sanguini del sistema ABO humà. Aquesta línia cel·lular va ser gentilment cedida pels laboratoris Knickerbocker SAE (Barcelona).

8.6. MEDIS DE CULTIU.

8.6.1. Medi base.

El medi base que s'utilitza pel cultiu d'hibridomes és el DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Aquest medi comercial conté sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines imprescindibles pel creixement de l'hibridoma. La seva composició es detalla a la Taula 8.1. Per a la preparació del medi base cal realitzar una solució amb els següents components:

| | |
|--|---------|
| DMEM (Biological Industries, 11-055-1K) | 13.83 g |
| L-Glutamina (Sigma, G-5763) | 0.292 g |
| NaHCO ₃ (Panreac) | 3.7 g |
| Aigua ultrapura | 1 litre |
| (Obtinguda en un aparell d'ultrafiltració Milli-Q Plus, Millipore) | |

Per a la realització d'experiments en què es modifica la concentració inicial d'algun dels components del medi s'utilitza DMEM (Sigma D-5030). Aquest medi no conté glucosa, glutamina ni roig de fenol, per aquest motiu, si es precisa preparar el medi base a partir del DMEM corresponent a aquesta referència cal utilitzar la següent formulació:

| | |
|-------------------------------|---------|
| DMEM (Sigma, D-5030) | 8.32 g |
| Glucosa (Panreac) | 4.5 g |
| L-Glutamina (Sigma, G-5763) | 0.877 g |
| Roig de fenol (Sigma, P-5530) | 0.015 g |
| NaHCO ₃ (Panreac) | 3.7 g |
| Aigua ultrapura | 1 litre |

Aquesta solució també se l'anomena en aquest treball com a medi concentrat 1x. Els medis s'esterilitzen per filtració mitjançant membranes de 0.22 µm de diàmetre de porus (Millipore, Sterivex-GP per a volums inferiors a 2 litres i Steripak-GP10 per a volums

superiors a 10 litres) a l'interior d'una cambra de flux laminar vertical (Telstar, AV-100). Per impulsar el medi s'utilitza una bomba peristàtica (Masterflex, 7521-45) amb un capçal Masterflex, Easy-Load 7518-00.

| Components | mg/l |
|--|-------|
| Sals inorgàniques | |
| CaCl ₂ | 200 |
| Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O | 0.1 |
| KCl | 400 |
| MgSO ₄ | 97.67 |
| NaCl | 6400 |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 125 |
| Aminoàcids | |
| L-Arginina·HCl | 84 |
| L-Cistina·2HCl | 62.57 |
| L-Glutamina | 584 |
| Glicina | 30 |
| L-Histidina·HCl·H ₂ O | 42 |
| L-Isoleucina | 105 |
| L-Leucina | 105 |
| L-Lisina·HCl | 146 |
| L-Metionina | 30 |
| L-Fenilalanina | 66 |
| L-Serina | 42 |
| L-Treonina | 95 |
| L-Triptòfan | 16 |
| L-Tirosina (sal disòdica) | 104.2 |
| L-Valina | 94 |
| Vitamines | |
| D-Àcid pantotènic (sal càlcica) | 4 |
| Colina, clorur | 4 |
| Àcid fòlic | 4 |
| i-Inositol | 7.2 |
| Nicotinamida | 4 |
| Piridoxal·HCl | 4 |
| Riboflavina | 0.4 |
| Tiamina·HCl | 4 |
| Altres components | |
| Glucosa | 4500 |
| Roig de fenol | 15 |

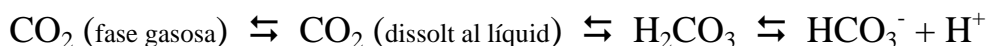
Taula 8.1. Composició del medi DMEM (Biological Industries, 11-055-1K).

Posteriorment, és necessari suplementar el medi esterilitzat amb els següents components (quantitats per litre de medi i concentracions entre parèntesi):

| | | |
|--|--------|---------------|
| Sèrum fetal de vedella (FCS, Fetal calf serum) | 20 ml | (2%(v/v)) |
| -mercaptoetanol (Solució 0.1 M) | 0.5 ml | (0.05 mM) |
| Insulina (Solució 4 UI/ml) | 0.5 ml | (0.002 UI/ml) |

La preparació de les solucions estoc de cadascun d'aquests components es descriu a l'apartat 8.6.4.

La presència de NaHCO_3 al medi permet mantenir el pH d'aquest a un valor inicial de 7.1 que és l'òptim requerit pel cultiu d'hibridomes. El control de pH es porta a terme mitjançant el tampó CO_2 - NaHCO_3 que requereix la presència d'una atmosfera de 5-10% de CO_2 al cultiu (bé en un incubador de CO_2 , o bé, en un bioreactor equipat amb subministrament de CO_2). Les reaccions d'equilibri que es donen al medi són les següents:



El valor del pH es manté proper a 7.1 sempre i quan no es produeixin quantitats elevades de lactat durant el cultiu. El roig de fenol és l'indicador de pH present al medi. El medi esdevé rosa quan el pH és superior a 7.6, vermell si el pH es troba entre 7.6 i 7.0, taronja quan varia entre 7.0 i 6.6, i groc quan es troba per sota de 6.6.

El medi es manté a 4 °C en absència de llum durant un període no superior a dos mesos. Aquest medi DMEM base, amb unes concentracions inicials de glucosa 25 mM i glutamina 6 mM, és el que s'ha utilitzat per mantenir la línia cel·lular, fer créixer inòculs i realitzar experiments de cèl·lules en suspensió.

8.6.2. Medi d'alimentació per al cultiu en *fed-batch*.

El medi d'addició que s'ha emprat pels cultius d'hibridomes en *fed-batch* ha estat una solució realitzada a partir del medi basal BIOPRO sense sals ni aminoàcids (BioWhittaker Europe). Aquest medi comercial no conté sals inorgàniques, glucosa, glutamina ni sèrum. Per a la preparació del medi d'addició cal realitzar una solució amb els següents components:

| | |
|---|----------|
| Aminoàcids iguals als presents en el medi DMEM (tots menys Cys i Gln) | 50 mg/Aa |
| L-Cistina·2HCl (Sigma, C-2045) | 0.22 g |
| L-Glutamina (Sigma, G-5763) | 2.2 g |
| Glucosa (Panreac) | 10.8 g |

BIOPRO sense sals (BioWhittaker Europe) 139 ml

Aquesta solució s'esterilitza per filtració mitjançant membranes de 0.22 µm de diàmetre de porus (Millipore, Sterivex-GP) a l'interior d'una cambra de flux laminar vertical (Telstar, AV100). Posteriorment és necessari suplementar el medi esterilitzat amb els següents components fins arribar a una solució de 200 ml de volum final:

| | |
|--|--------------------|
| Sèrum fetal de vedella (FCS, Fetal calf serum) | 40 ml (2%(v/v)) |
| -mercaptoetanol (Solució 0.1 M) | 0.25 ml (0.125 mM) |
| Insulina (Solució 4 UI/ml) | 1 ml (0.02 UI/ml) |
| Solució de vitamines 100x (Sigma, M-6895) | 20 ml |

La solució es manté a 4 °C en absència de llum durant el període en què s'allarga el cultiu.

8.6.3. Medis basals concentrats.

Per a la realització dels cultius d'hibridomes en aquest treball s'han utilitzat fins a tres medis basals de composicions diferents. El medi concentrat 1x s'ha definit a l'apartat 8.6.1, al qual se li afegeix per cada litre 20 ml de solució al 10% de F-68 Pluronic i 5 ml de solució al 1% d'antiescumejant AF/C quan s'utilitza per fer experiments al bioreactor. Els medis concentrats 2x i 1.5x tenen en comú les quantitats dels compostos següents:

| | |
|-------------------------------|---------|
| DMEM (Sigma, D-5030) | 8.32 g |
| Roig de fenol (Sigma, P-5530) | 0.015 g |
| NaHCO ₃ (Panreac) | 3.7 g |
| Aigua ultrapura | 1 litre |

i difereixen en les quantitats d'aminoàcids, vitamines i glucosa que cal afegir com es recull a la Taula 8.2. Posteriorment, les solucions ja esterilitzades per filtració, el medi 2x i 1.5x se suplementen amb les següents solucions:

| Medi concentrat | 2x | 1.5x |
|--|--------------------|-----------------------|
| F-68 Pluronic (Solució 10%(p/v)) | 40 ml (0.4%(v/v)) | 30 ml (0.4%(v/v)) |
| Antiescumejant AF/C (Solució 1%(p/v)) | 5 ml (50 ppm) | 5 ml (50 ppm) |
| Sèrum fetal de vedella (FCS, Fetal calf serum) | 40 ml (2%(v/v)) | 30 ml (2%(v/v)) |
| -mercaptoetanol (Solució 0.1 M) | 1 ml (0.1 mM) | 0.75 ml (0.075 mM) |
| Insulina (Solució 4 UI/ml) | 1 ml (0.004 UI/ml) | 0.75 ml (0.003 UI/ml) |

| Components | mg | |
|----------------------------------|-----------|-------------|
| | 2x | 1.5x |
| Aminoàcids | | |
| L-Arginina-HCl | 84 | 42 |
| L-Cistina-2HCl | 62.57 | 31.29 |
| L-Glutamina | 1169 | 730.5 |
| Glicina | 30 | 15 |
| L-Histidina·HCl·H ₂ O | 42 | 21 |
| L-Isoleucina | 105 | 52.5 |
| L-Leucina | 105 | 52.5 |
| L-Lisina-HCl | 146 | 73 |
| L-Metionina | 30 | 15 |
| L-Fenilalanina | 66 | 33 |
| L-Serina | 42 | 21 |
| L-Treonina | 95 | 42.5 |
| L-Triptòfan | 16 | 8 |
| L-Tirosina (sal disòdica) | 104.2 | 52.1 |
| L-Valina | 94 | 47 |
| Vitamines | 2x | 1.5x |
| D-Àcid pantotènic (sal càlcica) | 4 | 2 |
| Colina, clorur | 4 | 2 |
| Àcid fòlic | 4 | 2 |
| i-Inositol | 7.2 | 3.6 |
| Nicotinamida | 4 | 2 |
| Piridoxal-HCl | 4 | 2 |
| Riboflavina | 0.4 | 0.2 |
| Tiamina-HCl | 4 | 2 |
| Sucres | 2x | 1.5x |
| Glucosa | 4500 | 2250 |

Taula 8.2. Composició d'aminoàcids, vitamines i glucosa que cal afegir al medi base DMEM per preparar els medis concentrats 2x i 1.5x.

8.6.4. Preparació d'estocs dels components per suplementar els medis.

Com s'ha especificat anteriorment, els medis de cultiu emprats se suplementen amb unes solucions estoc estèrils de sèrum (FCS), -mercaptoetanol, insulina i en determinats casos, antiescumejant (AF/C) i F-68 Pluronic, en diferents proporcions segons el medi a formular, a partir d'unes solucions estoc preparades com es descriuen a continuació:

Sèrum fetal de vedella (FCS)

El sèrum emprat als experiments és subministrat per Biological Industries (ref. 04-001, lot 651493). Les característiques d'aquest lot de sèrum es recullen a la Taula 8.3. Aquest sèrum ve subministrat en ampolles de 500 ml i s'emmagatzema a -30 °C.

Prèviament a la seva utilització cal procedir a la inactivació del complement que hi pugui haver en el sèrum. El complement és un conjunt de proteïnes presents a la fracció globulínica del sèrum que actuen com a elements inespecífics del sistema immunitari i que poden provocar lisi cel·lular. Les proteïnes del complement, a diferència de les immunoglobulines, són termosensibles, per aquest motiu cal inactivar-les incubant el sèrum a 56 °C durant 30 minuts. Una vegada s'ha inactivat el sèrum es preparen alíquotes estèrils de 10, 20 i 50 ml, i es guarden a -30 °C.

| CARACTERÍSTIQUES FÍSIQUES | |
|----------------------------|-------------|
| pH | 7.61 |
| Osmolaritat | 303 mOsm/kg |
| CARACTERÍSTIQUES QUÍMIQUES | |
| Proteïna total | 46 mg/ml |
| Albúmina | 19 mg/ml |
| Globulina total | 27 mg/ml |
| IgG | 49 µg/ml |
| Hemoglobina | 201.8 µg/ml |

Taula 8.3. Característiques físiques i químiques del lot de sèrum fetal de vedella (FCS) emprat.

-mercaptoetanol

Es prepara una solució de 70 µl de -mercaptoetanol (Sigma, M-6250) en 10 ml de medi DMEM base per obtenir una concentració final de 0.1 M. Aquesta solució s'esterilitza per filtració i es preparen alíquotes de 0.6 ml en tubs *Eppendorf* estèrils que es guarden a -30 °C. La proporció d'aquesta solució que s'afegeix al medi de cultiu és de 0.5 ml per litre de medi.

F-68 Pluronic

Es prepara una solució de 25 g de F-68 Pluronic (Sigma, P-1300) en 250 ml d'aigua ultrapura per obtenir una concentració final de 100 g/l (10% (p/v)). Aquesta solució s'autoclava a 121°C durant 30 minuts i posteriorment es guarda a 4°C per al seu ús posterior. Habitualment, la proporció d'aquesta solució que s'afegeix al medi de cultiu és de 20 ml per litre de medi (0.2% (p/v)).

Antiescumejant

Es prepara una solució de 3 ml d'antiescumejant Antifoam C 30% (p/v) (Sigma, A-8011) en 90 ml d'aigua ultrapura per obtenir una concentració final de 10 g/l (1% (p/v)).

Aquesta solució s'autoclava a 121 °C durant 30 minuts i posteriorment es guarda a 4 °C per al seu ús posterior. La proporció d'aquesta solució que s'afegeix al medi de cultiu és de 5 ml per litre de medi (50 ppm).

Insulina

Es prepara una solució de 0.5 ml d'insulina (Actrapid HM Novo, Insulina Humana Monocomponent, 40 UI/ml) estèril en 4.5 ml de medi base DMEM estèril per obtenir una concentració final de 4 UI/ml (0.16 mg/ml). Per mantenir les condicions d'esterilitat s'utilitza una xeringa de 1 ml estèril per agafar el volum d'insulina anteriorment indicat. La solució es guarda en una ampolla estèril a 4 °C. La proporció d'aquesta solució que s'afegeix al medi de cultiu és de 0.5 ml per litre de medi.

8.7. MANTENIMENT DE LA LÍNIA CEL·LULAR.

La línia cel·lular emprada en el treball es conserva en criotubs congelats en nitrogen líquid a una temperatura de -196 °C. En el moment en què cal iniciar els experiments es descongela un dels criotubs i s'inicia un cultiu en suspensió de l'hibridoma. Aquest cultiu es pot anar ressemblant durant un període no superior a tres mesos. El manteniment de l'esterilitat en tots aquests processos és d'extrema importància, per aquest motiu cal comprovar regularment l'absència de contaminacions.

8.7.1. Congelació d'hibridomes.

Per la preparació d'un estoc de 10 criotubs (Nunc, 377267) de cèl·lules congelades cal seguir el següent protocol:

Es fa créixer 160 ml (4 flascons amb 40 ml) d'un cultiu de cèl·lules fins que es trobin a la meitat de la fase exponencial (aproximadament a les 48 hores de cultiu). És de vital importància que les cèl·lules es trobin en aquest punt del seu creixement, ja que la seva viabilitat ha de ser alta (> 90%).

Es preparen els medis de congelació:

- **MEDI A:** Medi DMEM base amb 10% (v/v) de FCS (5 ml de FCS + 45 ml de DMEM). Es manté a temperatura ambient.

- **MEDI B:** Medi DMEM base amb 10% de FCS (v/v) i 20% (v/v) de dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma, D-2650) (1 ml de FCS + 2 ml de DMSO + 7 ml de DMEM). Es manté a 4 °C.

Es transfereixen els cultius a congelar (160 ml) a tubs de centrífuga de 50 ml (Nunc, 339497) i se centrifuguen a 500 g durant 5 minuts. Es descarta el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules (sediment) amb un total de 40 ml de medi A. S'agafa una petita alíquota de 75 µl per tal de determinar la concentració i viabilitat cel·lular. A partir de la concentració de cèl·lules viables es calcula el volum de medi amb què caldrà resuspendre el cultiu després de la propera centrifugació per tal d'obtenir una concentració final de 8×10^6 cèl·lules viables/ml.

Es centrifuguen els 40 ml a 500 g durant 5 minuts. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el sediment amb la meitat del volum calculat anteriorment de medi A. Les cèl·lules es mantenen 10 minuts a 4 °C.

S'afegeix l'altra meitat del volum, en aquest cas de medi B (amb DMSO). El DMSO és un crioprotector que pot penetrar a l'interior de la cèl·lula, però que és altament tòxic per aquesta. Per aquest motiu, és important que en el moment d'afegir el medi B la cèl·lula estigui a 4 °C, i que l'addició es faci lentament per tal d'evitar un xoc.

Es transfereix la suspensió de cèl·lules als criotubs, prèviament preparats en una gradeta amb gel. A cada criotub es posa 1 ml de la suspensió cel·lular. La solució final en què les cèl·lules es mantindran congelades té un 10% de FCS i DMSO (0.5 ml de medi A i 0.5 ml de medi B).

Els criotubs es porten ràpidament al congelador de -80 °C (Nuair, UN-6512E). A les 24 hores es transfereixen els criotubs al contenidor de nitrogen líquid (Forma Scientific, CMR 8031, Cryomed).

8.7.2. Descongelació d'hibridomes.

A continuació es descriuen els passos del procés de descongelació. Es preparen els medis de descongelació:

- **MEDI C:** Medi DMEM base amb 20% (v/v) de FCS (4 ml de FCS + 16 ml de DMEM). Es reparteixen 10 ml del medi C en 2 tubs de centrífuga estèrils (Nunc, 339497) i es posen a 37 °C.
- **MEDI D:** Medi DMEM base al 2% (v/v) de FCS. Es manté a 37 °C.

S'agafa un criotub del congelador de nitrogen líquid i es posa a l'incubador de CO₂ a 37 °C. És important que la suspensió cel·lular no es deixi més temps del necessari per descongelar-se, ja que el medi de congelació porta DMSO que és tòxic per a les cèl·lules.

Quan el contingut del criotub s'ha descongelat s'afegeixen unes gotes dels 10 ml de medi C escalfat a 37 °C, s'homogeneïtza la suspensió cel·lular amb una pipeta Pasteur estèril i es passa tota la suspensió al tub de centrífuga que conté la resta dels 10 ml de medi C.

Es centrifuga a 500 g durant 5 minuts. Per tal d'eliminar el DMSO que porta el medi de congelació s'elimina el sobrenedant i es realitza un segon rentat resuspent el sediment amb els 10 ml de medi C restants. S'extreu una mostra de 75 µl i es recompten les cèl·lules viables i mortes. Amb aquestes dades es pot calcular el volum de medi D que caldrà afegir per tenir una concentració cel·lular de 5×10^5 cèl·lules viables/ml i el percentatge de viabilitat que tindrà inicialment el cultiu.

Es centrifuga a 500 g durant 5 minuts. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el sediment amb el volum de medi D calculat anteriorment. Es transfereix a un flascó de cultiu i s'incuba a 37 °C a l'incubador de CO₂.

Alguna vegada els dos primers dies s'observa una davallada considerable de la viabilitat, per aquest motiu es canvia diàriament el medi de cultiu durant aquests dos primers dies. Cal procurar no utilitzar un inòcul inferior a 2×10^5 cèl·lules viables/ml.

8.7.3. Manteniment de la línia cel·lular en un cultiu en suspensió.

Una vegada es disposa de la línia cel·lular descongelada, les cèl·lules es cultiven en suspensió en flascons de 25 cm² durant un període d'uns tres mesos. L'inòcul utilitzat és de 2×10^5 cèl·lules viables/ml, els cultius es ressembren cada 2-3 dies, quan les cèl·lules es troben en plena fase exponencial, en 10 ml de medi DMEM base fresc. D'aquesta manera es proporciona de nou a les cèl·lules tots aquells nutrients que s'estaven exhaurint (glucosa, glutamina, altres aminoàcids, vitamines o components del sèrum) i s'eliminen tots aquells subproductes cel·lulars que poden tenir un efecte tòxic per a la cèl·lula (amoni i lactat que acidifiquen el medi).

Aquests cultius permeten disposar sempre d'un estoc de cèl·lules a partir del qual es poden fer créixer els inòculs per portar a terme els diferents experiments.

El procediment a seguir per fer el subcultiu o resembra de la línia cel·lular és el següent:

Es treu una mostra del flascó de cultiu amb una pipeta Pasteur i es realitza un recompte de les cèl·lules viables mitjançant un microscopi invertit de contrast de fases (Nikon, TMS-F). Es calcula del volum del cultiu vell que cal centrifugar per obtenir l'inòcul desitjat en el cultiu nou. Això es porta a terme aplicant la següent expressió (Eq. 8.1):

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1} \quad (\text{Eq. 8.1})$$

on V_1 és el volum de cultiu vell en ml que cal centrifugar en ml, V_2 el volum de medi fresc del cultiu nou (en aquest cas 10 ml) en ml, C_1 la concentració de cèl·lules viables que s'ha comptat prèviament al cultiu vell ($n \times 10^5$ cèl·lules viables/ml) i C_2 l'inòcul que es vol tenir en el cultiu nou (en aquest cas 2×10^5 cèl·lules viables/ml). Així doncs, en el cas d'aquesta ressembla, l'expressió es pot simplificar de la següent manera (Eq. 8.2):

$$V_1 = \frac{20}{n} \quad (\text{Eq. 8.2})$$

S'afegeixen 10 ml de medi fresc en el nou flascó de cultiu i s'incuba a 37°C i a una atmosfera del 5% de CO₂ per temperar i equilibrar el pH del medi. Se centrifuga el volum del cultiu vell calculat prèviament (V_1), a 500 g durant 5 minuts. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el sediment amb els 10 ml de medi fresc que estaven a 37°C. El nou cultiu s'incuba a 37 °C en una atmosfera al 90% d'humitat i 5% de CO₂. Aquesta operació es va repetint cada 2-3 dies en els següents tres mesos.

8.7.4. Control de l'esterilitat dels cultius

Les característiques intrínseques dels cultius de cèl·lules animals, velocitats de creixement cel·lular lentes i medis molt rics en nutrients, fan que aquests cultius siguin molt susceptibles a possibles contaminacions. Per aquest motiu, una extremada cura en tots els processos de manipulació i un control regular de l'esterilitat dels cultius són els dos factors bàsics per evitar l'aparició de qualsevol contaminació en la línia cel·lular.

La contaminació per bacteris, fongs o llevats es comprova regularment observant els cultius directament al microscopi òptic invertit de contrast de fase. En determinades ocasions es pot deduir que hi ha contaminació quan s'observen canvis en el color i terbolesa del medi de cultiu.

També és important realitzar un control regular de l'esterilitat dels medis de cultiu i dels diferents estocs de les solucions emprades per suplementar els medis. Per a realitzar

aquest control es posa 5 ml del medi o solució que es desitja comprovar en un flascó i s'incuba a 37 °C durant un o dos dies. Després s'observa directament al microscopi òptic invertit de contrast de fase. És també convenient realitzar aquesta operació sempre que es cregui que hi hagi hagut un procés de manipulació dubtós de qualsevol de les solucions suposadament estèrils utilitzades.

La contaminació per micoplasmes pot no ser òbvia en una observació al microscopi òptic, ja que els micoplasmes no sempre produeixen canvis apreciables en les característiques del medi o en la morfologia cel·lular. Molts micoplasmes creixen lentament i no destrueixen l'hibridoma, no obstant, poden produir anomalies en el metabolisme de la cèl·lula o alteracions en el seu creixement o viabilitat (Freshney, 1994) sense que sigui possible visualitzar la seva presència amb el microscopi òptic. Per aquest motiu es precisa d'altres mètodes que detecten la presència d'activitat enzimàtica pròpia d'aquests microorganismes, o bé permeten realitzar una tinció del seu DNA que posteriorment es pot observar en un microscopi de fluorescència. El dos mètodes que s'han emprat per comprovar els estocs de la línia cel·lular congelada són: Kit Mycotec (GIBCO, 189-572) i la tinció de DNA (Hoeschst Stain Kit, ICN, 33258); el fonament i el protocol d'aplicació d'ambdós mètodes s'ha descrit en un treball anterior (Sanfeliu, 1995).

8.8. CONFIGURACIONS I PROCEDIMENTS OPERACIONALS EN EL BIOSTAT MCD.

En aquest apartat es descriuen les diferents configuracions experimentals del Biostat MCD en cadascuna de les operacions emprades al llarg d'aquest treball (discontinu, *fed-batch* i continu en perfusió). També s'explica el procediment operacional que es porta a terme per a la preparació de cadascuna de les configuracions provades.

8.8.1. Operació en discontinu.

8.8.1.1. Configuració.

La tapa d'acer inoxidable del Biostat MCD disposa de set ports de 19 mm i deu ports de 6 mm. En l'operació en discontinu es destinen als següents elements:

Ports de 6 mm.

- Connexió per a la sonda de temperatura.
- Cànula d'entrada d'inòcul i sortida de la presa de mostra.
- Injector d'entrada de la purga de nitrogen.

- Injector d'entrada de la mescla de gasos.
- Injector de sortida de la mescla de gasos.
- Cànula de rentat de la sonda turbidimètrica.
- Suport del cistell de la membrana tubular de silicona.

Ports de 19 mm.

- Connexió per a la sonda de pH.
- Connexió per a la sonda de pO₂.
- Connexió per a la sonda turbidimètrica.
- Connexió del condensador de sortida de gasos per capçal.
- Injector de 2 boques, per a l'entrada de NaOH i el rentat de la sonda turbidimètrica.

La configuració del Biostat MCD per a l'operació en discontinu es representa a la Figura 8.9, i se'n poden destacar amb més detall alguns elements:

- Circuit d'entrada de la mescla de gasos: Aquest circuit s'inicia a l'estació de mescla de gasos de la DCU i s'acaba a l'entrada de la membrana tubular de silicona. Disposa en el seu recorregut d'un recipient humitejador de gasos i d'un filtre (Millipore, Millex FG-50) per a gasos de 0.22 µm de diàmetre de porus per tal d'assegurar l'esterilitat del bioreactor.
- Circuit de sortida de la mescla de gasos: Aquest circuit s'inicia a la sortida de la membrana tubular de silicona disposant en el seu recorregut d'un tanc pulmó amb un filtre per a gasos de 0.22 µm i el seu tram final es connecta al manoreductor de la DCU per així poder mantenir constant la pressió de la mescla de gasos a la membrana (pressió de treball 0.5 bars).
- Circuit de la purga de nitrogen: Aquest circuit permet l'entrada d'un cabal constant de nitrogen per la capçalera del bioreactor quan es requereix. D'aquesta forma, quan es realitzen mesures del consum o de la desorció de l'oxigen en el bioreactor s'aconsegueix mantenir a zero la concentració d'aquest a la superfície del brou. Per garantir l'entrada controlada de nitrogen s'utilitza una línia auxiliar de la DCU, amb rotàmetre i reductor de pressió, i una electrovàlvula de 3-vies Sirai que es comanda remotament. Disposa en el seu recorregut d'un recipient humitejador de gasos i d'un filtre per a gasos de 0.22 µm de diàmetre de porus.
- Circuit d'inoculació: És un recorregut de tub de silicona des de la cambra de flux laminar vertical fins al Biostat MCD que uneix l'ampolla d'inòcul de 2 litres i la cànula de mostratge. Quan l'inòcul està preparat, aquest circuit permet inocular el bioreactor amb les màximes condicions d'esterilitat.

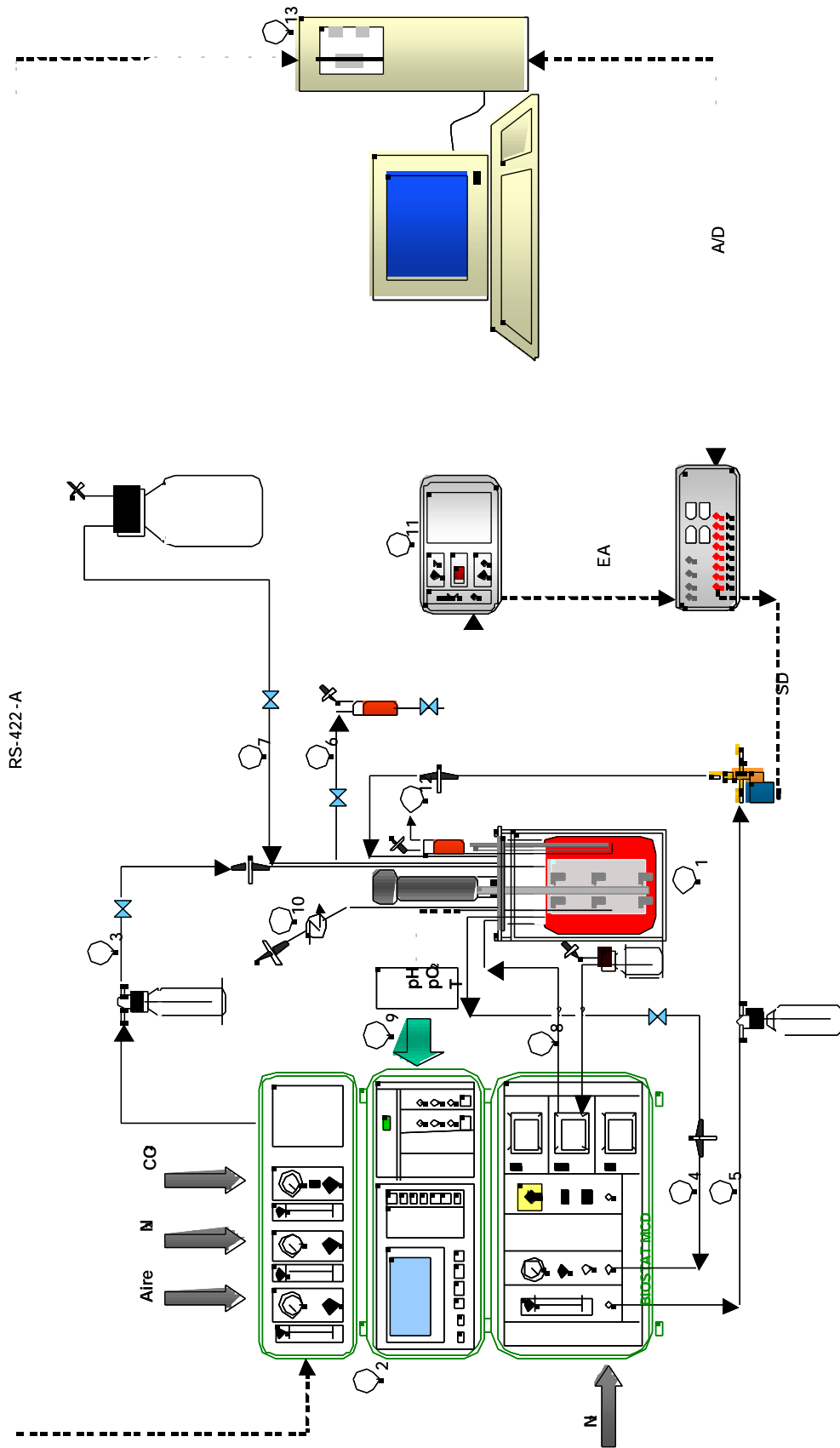


Figura 8.09. Muntatge experimental del reactor a l'operació en discontinu: 1) Bioreactor Braun Biostat MCD, 2) Unitat de control digital (DCU) i estació de mescla de gasos pO_2 Gas-Mix, 3) Circuit d'entrada de la mescla de gasos, 4) Circuit de sortida de la mescla de gasos, 5) Circuit de la purga de nitrogen, 6) Presa de mostra manual, 7) Circuit d'inoculació, 8) Circuit d'addició de NaOH, 9) Sondes de temperatura, pH i pO_2 , 10) Condensador de la sortida de gasos per capçal, 11) Sonda Aquasant AP44 i transmissor AS82, 12) Circuit de rentat del sensor turbidimètric (Figura 8.15), 13) Ordinador de gestió i control.

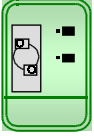


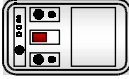
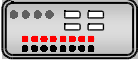

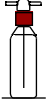






| | |
|---|---|
|  | Bomba de membrana dosificadora Braun FE-211 |
|  | Bomba peristàltica Ismatec REGLO-Analogue |
|  | Bomba peristàltica MasterFlex L/S |
|  | Turbidímetre Aquasant AS82 |
|  | Caixa de comunicacions A/D |
|  | Electrovàlvula de 3-vies Sirai |
|  | Mòdul de microfiltració Microgon CellFlo |
|  | Humitejador de gasos Alco |
|  | Ampolla de 2000, 1000 o 250 ml de volum amb filtre de 0.22 µm |
|  | Tanc de recepció de mostra |
|  | Filtre Millipore per a gasos de 0.22 µm |
|  | Pinça de tancament per a cultiu cel·lular |
|  | Línia de circuit de fluid (gas o líquid) |
|  | Línia de circuit elèctric de comunicacions |
|  | Condensador de gasos per capçal |

Figura 8.10. Llegenda de les icones utilitzades per als esquemes dels tres tipus d'operació: discontinu, *fed-batch* i continu en perfusió (figures 8.9, 8.12, 8.13 respectivament).

- Presa de mostra manual: La mostra de medi del cultiu es pren a través del circuit d'inoculació. Una connexió en forma de T situada entre l'ampolla d'inòcul i la cànula de mostratge del Biostat MCD permet desviar el medi extret a un tub de presa de mostra. La quantitat de brou extret (de 5 a 10 ml) es controla a través d'una xeringa unida a un filtre per a gasos de 0.22 μm i connectada lateralment al tub de presa de mostra. Al fer entrar aire amb la xeringa, el medi restant del circuit es retorna al bioreactor estèrilment.
- Condensador de la sortida de gasos per capçal: La sortida dels gasos en excés o bé d'aquells que es produeixen en el cultiu surten a través d'un petit condensador al final del qual hi ha un tanc pulmó amb un filtre per a gasos de 0.22 μm de diàmetre de porus a la sortida. Aquest condensador preveu la sortida de líquid (per arrossegament amb els gasos o per evaporació) i així es pot mantenir el nivell del líquid de cultiu constant. La refrigeració del condensador es realitza fent circular aigua de xarxa.
- Circuit d'addició de NaOH: Un dels agents correctors del pH és la solució de NaOH 0.2 M. L'addició de NaOH es realitza amb la bomba d'àlcali del Biostat MCD i únicament és necessària per compensar la presència d'elevades concentracions de lactat provinents del metabolisme dels carbohidrats d'altas poblacions cel·lulars en el bioreactor. En els primers estadis del cultiu el control del pH del medi es realitza mitjançant l'addició de gasos. La difusió d'aquests en el reactor arrossega el CO_2 del tampó bicarbonat del medi i produeix un augment del pH; aquest fenomen es controla amb la funció control de pH de la DCU mitjançant l'addició de petits polsos de CO_2 que ajuden a mantenir el pH en valors propers a 7.02.
- Circuit de rentat del sensor turbidimètric (Figura 8.11): L'acumulació de bombolles d'aire sobre la superfície del sensor Aquasant AF44 CS/R provoca tal soroll en la lectura que el deixa inoperant en les condicions de cultiu normals. Per tant, es dissenya un dispositiu que permet realitzar lectures turbidimètriques en continu. Dins del bioreactor, col·locada al costat del sensor, hi ha una cànula de 6 mm, i al final d'aquesta s'hi connecta un colze de 90° i 6 mm de diàmetre. La sortida del colze es col·loca tangencialment i centrada a la superfície del sensor. A l'exterior, la cànula està connectada a un tanc pulmó de 3-vies. Una de les vies superiors es connecta a un conducte de silicona que mitjançant la bomba d'antiescumejant del Biostat MCD xucla el medi del cultiu, emplenant el tanc pulmó fins al volum requerit. En cas d'accident (p. ex. la bomba no s'atura) el medi es recircula dins el bioreactor per l'injector de 2 boques. L'altra via es connecta a un circuit d'aire proporcionat pel compressor intern de la DCU. L'entrada del gas impulsor es controla amb una línia auxiliar de la DCU, amb cabalímetre màssic, rotàmetre i una electrovàlvula de 3-vies Sirai comandada remotament. Disposa en el seu recorregut d'un recipient humitejador de gasos i d'un filtre per a gasos de 0.22 μm de diàmetre de porus. La

seqüència d'operació s'executa remotament en cicles de 90 s dividint-se en dos etapes. A l'inici del cicle el tanc s'emplena (69 segons de durada), mitjançant la bomba d'antiescumejant del Biostat MCD i el tub-capçal de silicona (Masterflex L/S16, 6424-16), amb brou fins a l'alçada necessària, mentre que l'entrada del gas impulsor resta tancada. Un cop s'assoleix el nivell s'atura la bomba i s'obre l'electrovàlvula durant 3.2 segons, baixant tot el líquid en contracorrent i velocitat alta (450 ml/min). El líquid arrossega les bombolles acumulades sota el sensor amb una mínima entrada de gas del circuit impulsor. Després d'un temps d'espera de 17.8 segons es torna a iniciar un nou cicle de rentat.

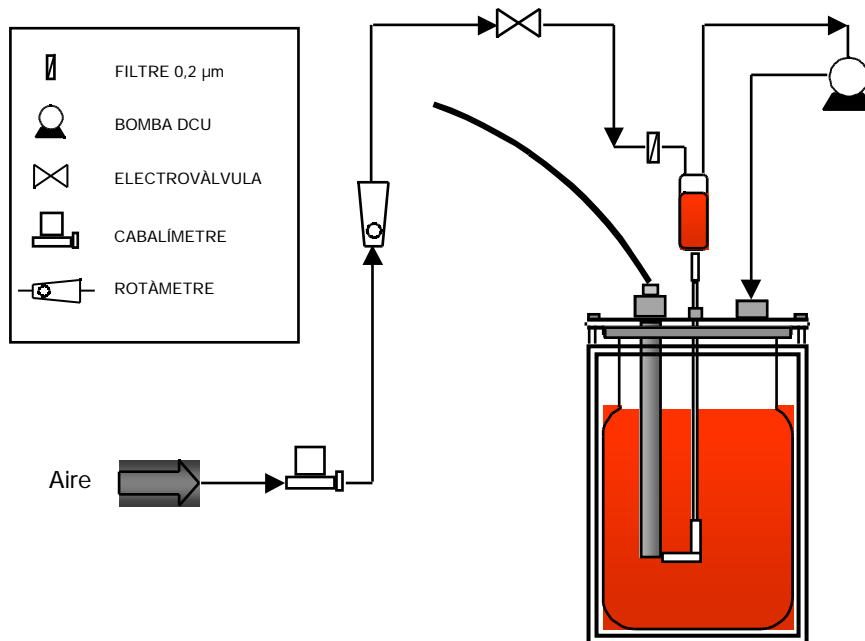


Figura 8.11. Muntatge del circuit de rentat del sensor turbidimètric.

8.8.1.2. Preparació del bioreactor.

Després de muntar els diferents components del bioreactor, es revisa i es collen les diverses connexions existents. La mescla de gasos es realitza a través de la DCU mitjançant l'estació de gasos i amb el controlador tipus pO_2 Gas-Mix. La sonda de pH i la bomba d'addició de NaOH (9.3 ml/min) es calibren prèviament a l'esterilització del reactor.

Abans de l'esterilització, el reactor s'omple amb tampó PBS 0.1 M (pH 7.4), (definició de la composició del tampó PBS a l'apartat 8.9.2.3). També s'omple amb aigua la camisa termostatitzada per tal de garantir una bona transferència de calor durant l'esterilització.

Es rosquen a la tapa del bioreactor les sondes de temperatura, pH, pO₂ i turbidimètrica. També es preparen tots els filtres i les connexions elèctriques dels cables de les sondes per evitar que es mullin durant l'esterilització (cinta, gomes, cotó, paper d'embolicar i/o paper d'alumini). És important rosca tots els taps menys un, obrir o tancar les pinces necessàries per evitar la pèrdua de líquid sense crear cap possible punt de sobrepressió durant l'autoclavat. Cal deixar sempre un tap obert per permetre que s'equilibri la pressió.

Tot l'equip muntat s'autoclava a 121°C durant 30 minuts.

Al finalitzar el procés d'autoclavat, es rosca el tap obert, i es comprova que totes les connexions, muntatges i filtres estan en bon estat. Es connecta l'entrada i sortida d'aigua de la camisa i s'acaba d'omplir aquesta per evitar la presència d'aire al circuit. Es connecta també l'entrada i sortida d'aigua del condensador. S'obren les entrades i sortides de gasos, es connecten els diferents cables de les sondes als seus respectius connectors de la DCU i el turbidímetre Aquasant AS82.

Es buida la solució de PBS present a l'interior del reactor durant l'autoclavat pel circuit d'inoculació. Simultàniament, cal aturar el control de temperatura per tal d'evitar el sobreescalfament de l'aigua de la camisa en absència de líquid al reactor. Es fa el canvi d'ampolla a la cambra de flux laminar vertical i pel mateix circuit s'introdueix estèrilment el medi DMEM definit per a cada cultiu.

La pressió d'entrada dels diferents gasos al sistema es consignen a 1 bar, se sintonitzen els rotàmetres d'aire i N₂ a 1000 ml/min, i el de CO₂ a 100 ml/min. El manoreductor de sobrepressió de la membrana tubular de silicona s'ajusta a 0.5 bars. Seguidament, es procedeix a calibrar la sonda de pO₂ (la sonda de pO₂ s'ha de deixar polaritzant un mínim de 6 hores després de ser esterilitzada) consignant abans la temperatura a 37 °C i l'agitació a 60 rpm. S'ajusta el zero en la lectura de la sonda d'oxigen mitjançant l'entrada del 100% de N₂. Posteriorment es deixa entrar únicament aire i s'ajusta el 100% quan la lectura de la sonda d'oxigen assoleix un valor estable.

S'inicialitza l'entrada en funcionament de la resta de paràmetres de control del cultiu (pH: 7.02, pO₂: 60%, *Air Flow*: 450 ml/min). Es col·loca i se ceba el circuit d'addició de NaOH al capçal de bomba que li correspongui. Es deixa que les condicions de cultiu s'estabilitzin durant una hora per tal d'executar el protocol de càlcul de la K_{des} del medi (mínim 5 valors). Quan s'estigui realitzant una de les caigudes de pO₂ entre el 65-30% es farà el zero del sensor turbidimètric.

L'inòcul s'introdueix a l'ampolla estèrilmnt a la cambra laminar de flux vertical i per desplaçament amb gas es porta dins del bioreactor. Cal procurar no entrar un inòcul inferior a 2×10^5 cèl·lules viables/ml.

Entre 1-2 vegades al dia s'agafen mostres estèrils del cultiu es recompten les cèl·lules. Després se centrifuguen a 1700 g durant 5 minuts. Un cop s'ha centrifugat la mostra, es recull en un tub el sobrenedant i s'emmagatzema a -20 °C per poder realitzar posteriorment l'anàlisi del producte, dels substrats i d'altres metabolits cel·lulars.

Un cop ja està inoculat el bioreactor es posa en marxa la dinàmica de cultiu: s'agafen mostres per processar-les fora de línia, l'aplicació de mesura i control del procés **Sequen** executa les ordres definides de l'arxiu de protocol carregat i l'aplicació **Supervis** mostra l'evolució dels paràmetres més rellevants del cultiu, informació més detallada de com operen aquestes aplicacions es mostra al capítol *Desenvolupament del Programari de Control del Procés*.

8.8.2. Operació en *fed-batch*.

8.8.2.1. Configuració.

La configuració en l'operació en *fed-batch* (Figura 8.12) és pràcticament idèntica a la descrita a l'apartat 8.8.1.1. L'únic canvi que es realitza és la substitució de l'injector de 2 boques d'entrada de NaOH i rentat de la sonda turbidimètrica per un de 4 boques, per així poder incorporar al muntatge una tercera línia: el circuit d'addició de nutrients.

- **Circuit d'addició de nutrients:** L'addició de la solució, anomenada medi d'alimentació del *fed-batch* i descrita a l'apartat 8.6.2, es realitza amb la bomba Braun FE-211 i el capçal F0.1 descrits a l'apartat 8.2.6. L'ampolla de medi d'addició provinent del bioreactor es manté a l'interior d'un refrigerador (ZANUSSI, ZFC-70) proper al muntatge i s'embolica en paper d'alumini per protegir-la de la llum.

8.8.2.2. Preparació del bioreactor.

La preparació del Biostat MCD per a cultius en *fed-batch* és exactament igual a la descrita a l'apartat 8.8.1.2 d'aquest capítol per a la preparació del bioreactor en discontinu. L'únic que s'ha de tenir en comte és que abans de començar l'addició de nutrients s'ha de canviar l'ampolla de medi a la cambra laminar de flux vertical i, seguidament, encebar el circuit procurant que no hi quedin bombolles d'aire en la línia, i així tenir preparat el circuit d'addició de nutrients per poder controlar les addicions amb el programa de control del procés.

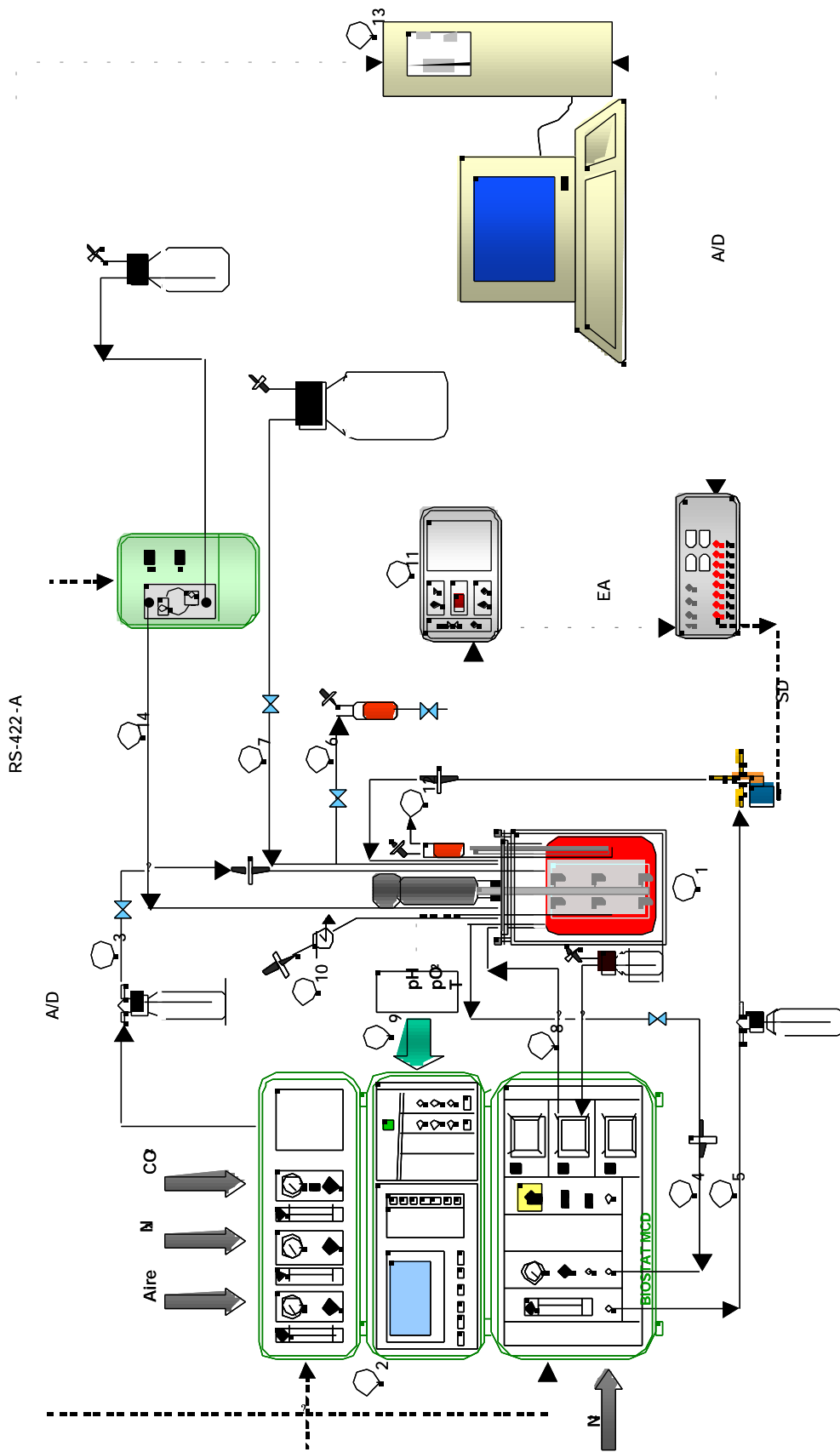


Figura 8.12. Muntatge experimental del reactor a l'operació en *fed-batch*: 1) Bioreactor Braun Biostat MCD, 2) Unitat de control digital (DCU) i estació de mescla de gasos pO_2 *Gas-Mix*, 3) Circuit d'entrada de la mescla de gasos, 4) Circuit de sortida de la mescla de gasos, 5) Circuit de la purga de nitrogen, 6) Presa de mostra manual, 7) Circuit d'inoculació, 8) Circuit d'addició de NaOH, 9) Sondes de temperatura, pH i pO_2 , 10) Condensador de la sortida de gasos per capçal, 11) Sonda Aquasant AF44 i transmissor AS82, 12) Circuit de rentat del sensor turbidimètric (Figura 8.15), 13) Ordinador de gestió i control, 14) Circuit d'addició de nutrients.

8.8.3. Operació en continu amb perfusió.

8.8.3.1. Configuració.

La configuració de l'operació en perfusió (Figura 8.13) inclou tots els elements descrits a l'apartat 8.8.1.1 per a l'operació en discontinu, menys el circuit de rentat del sensor turbidimètric que en aquesta configuració es realitza amb el circuit de recirculació del brou de cultiu. Per al muntatge del cultiu en perfusió s'efectua una nova disposició dels elements. Aquests nous elements es descriuen a continuació.

Els nous elements a considerar a la tapa del bioreactor són:

Ports de 6 mm.

- Entrada de la mescla de gasos pel microdifusor.
- Cànula de sortida del medi recirculat.
- Connexió del sensor de nivell #1 (NL₁).
- Connexió del sensor de nivell #2 (NL₂).

També s'han de considerar els elements que s'incorporen per a la configuració final de l'operació del cultiu en continu amb perfusió:

- Circuit d'addició de nutrients: L'addició de medi fresc per a l'operació en continu amb perfusió, anomenat medi concentrat (1x, 1.5x i 2x) i descrit a l'apartat 8.6.3, es realitza amb la bomba Braun FE-211 i el capçal F0.1 descrits a l'apartat 8.2.6. L'entrada del medi al bioreactor s'efectua per l'injector de 2 boques utilitzat en l'operació en discontinu i està comandada pel programa de control.
- Circuit de recirculació: El medi del bioreactor és recirculat mitjançant la bomba peristàtica Masterflex L/S 7521-45 a través del mòdul de microfiltració CellFlo muntat verticalment, ambdós elements descrits als apartats 8.2.2 i 8.2.6. Es treballa a un cabal de recirculació inicial de 250 ml/min (tub-capçal Masterflex L/S17, 6424-17) per evitar la deposició de material cel·lular sobre les fibres buides del mòdul CellFlo i així prevenir la possible pèrdua d'eficiència del cartutx. Una altra funció d'aquest circuit és el rentat continu de la superfície del sensor turbidimètric de forma similar a com es fa en l'operació en discontinu. Al final de la cànula de 6 mm, per on es retorna el medi recirculat, es connecta un colze de 90° i 6 mm de diàmetre. La sortida del colze es col·loca al costat de la superfície del sensor tangencialment i centrada. L'alta velocitat de recirculació fa que les bombolles d'aire no quedin atrapades sota la superfície, eliminant d'aquesta forma el soroll del senyal i disminuint la complexitat, respecte als muntatges anteriors, en aquest punt del sistema.

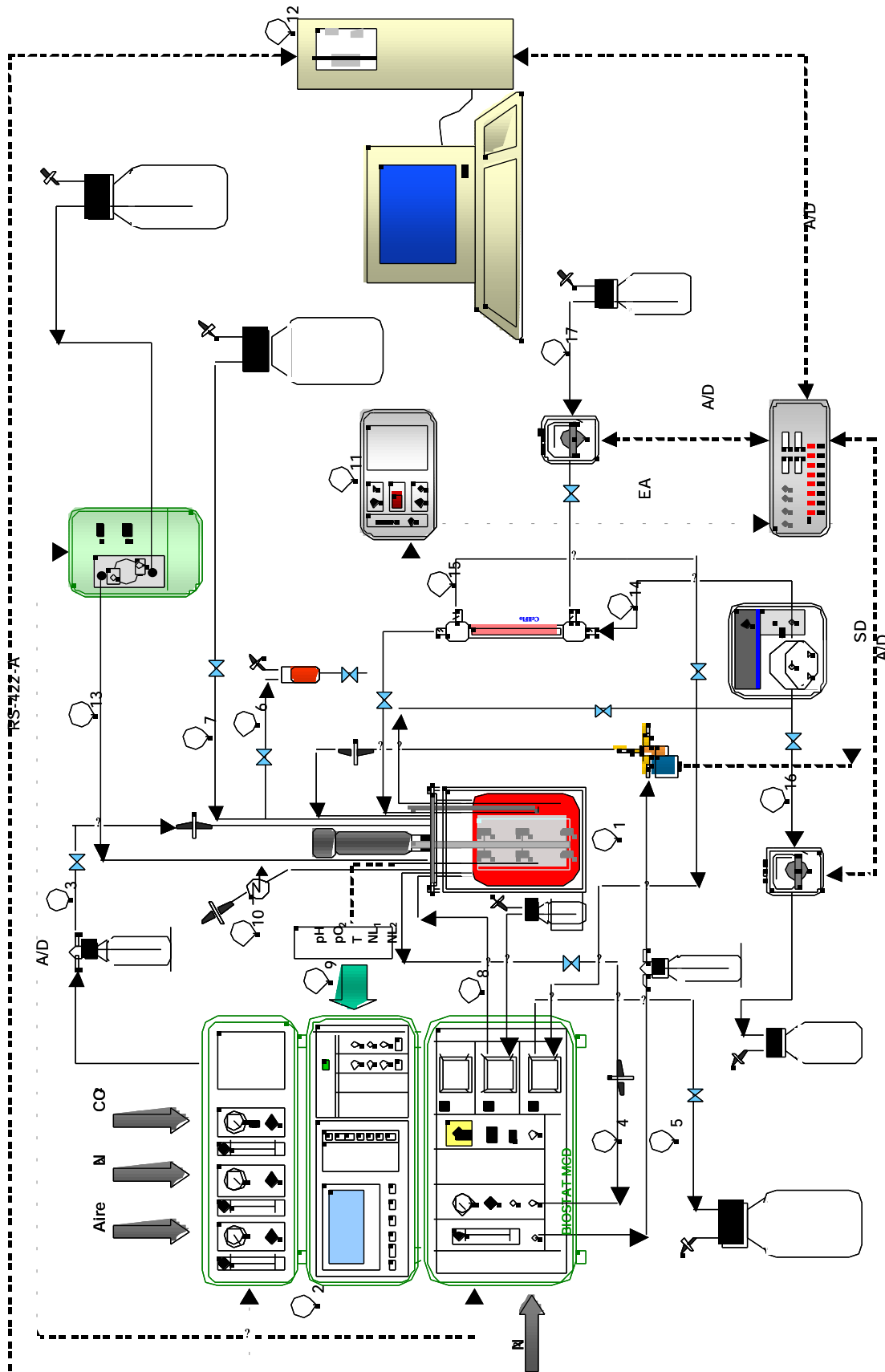


Figura 8.13. Muntatge experimental del reactor a l'operació en continu amb perfusió: 1) Bioreactor Braun Biostat MCD, 2) Unitat de control digital (DCU) i estació de mescla de gasos pO_2 Gas-Flow Ratio, 3) Circuit d'entrada de la mescla de gasos, 4) Circuit de sortida de la mescla de gasos, 5) Circuit de la purga de nitrogen, 6) Presa de mostra manual, 7) Circuit d'inoculació, 8) Circuit d'addició de NaOH, 9) Sondes de temperatura, pH, pO_2 i nivell (NH_4 i NH_2), 10) Condensador de la sortida de gasos per capçal, 11) Sonda Aquasant AF44 i transmissor AS82, 12) Ordinador de gestió i control, 13) Circuit d'addició de nutrients, 14) Circuit de recirculació, 15) Circuit d'eliminació del medi exhaurit, 16) Circuit de retronejeja del mòdul CellFlo.

- Circuit d'eliminació del medi exhaurit: La retirada del medi exhaurit del bioreactor es realitza a través de la boca de sortida lateral del mòdul de microfiltració CellFlo (la més allunyada a l'entrada al mòdul del circuit de recirculació del cultiu), i amb la bomba i funció del control d'escuma (FOAM) del Biostat MCD. Aquesta bomba treballa com agent actuador en el control de nivell del bioreactor a un cabal de sortida de 5.7 ml/min (tub-capçal Masterflex L/S14, 6402-14), mesurat abans de l'inici del cultiu, i actuant per cicles temporals de 10 segons cada vegada que el sensor de nivell #1 (NL₁) dona senyal positiu. D'aquesta manera s'aconsegueix que el volum de treball del reactor sigui sempre constant. En cas d'accident, per exemple que la velocitat d'entrada d'aliment sigui superior a la de sortida del medi exhaurit degut a una obturació gradual del mòdul de microfiltració (pèrdua d'eficiència), s'ha previst posar el sensor de nivell #2 (NL₂) com a alarma per aturar l'alimentació del cultiu, i així evitar el sobreiximent del brou de cultiu.
- Circuit de purga cel·lular: Es connecta un circuit de purga al circuit de recirculació per a l'eliminació de cèl·lules mortes i material de la lisi cel·lular acumulats al sistema. Aquesta línia se situa a través d'una connexió en forma de T abans de la impulsió del medi per la bomba de recirculació. Treballa a un cabal de 0.28 ml/min (Ismatec, Silicone SC0309) amb la bomba Ismatec REGLO-Analogue descrita a l'apartat 8.2.6.
- Circuit de retroneteja: Durant el cultiu en perfusió se subministren entrades periòdiques (cada 4 hores) de medi concentrat fresc en contracorrent al mòdul de microfiltració CellFlo, per així minimitzar qualsevol obturació i perllongar la vida i eficàcia del filtre. Aquestes entrades de medi es realitzen amb una bomba Ismatec REGLO-Analogue descrita a l'apartat 8.2.6. i l'altra línia lateral del mòdul CellFlo. Cada cicle de retroneteja s'efectua a un cabal de 10 ml/min (Ismatec, Ismaprene SC0317) durant dos minuts.
- Circuit del microdifusor: Quan les condicions del cultiu ho requereixen (alta densitat cel·lular) la mescla de gasos es fa entrar pel microdifusor i no per la membrana tubular de silicona. Aquest circuit s'inicia a l'estació de mescla de gasos de la DCU i s'acaba a l'entrada del microdifusor de bombolles descrit a l'apartat 8.2.1. Disposa del mateix recorregut que el del circuit d'entrada de mescla de gasos ja descrit. Si es realitza aquest canvi s'han de variar els paràmetres del controlador, com s'ha descrit a l'apartat 8.1.3.

8.8.3.2. Preparació del mòdul CellFlo.

Els mòduls CellFlo poden ser esterilitzats a l'autoclau, per radiació o químicament. En aquest treball s'han autoclavat juntament amb la resta del circuit de perfusió que els conté. El procediment seguit és el següent:

- Calibrar prèviament les bombes de retroneteja (10 ml/min), d'eliminació del medi exhaurit (5.7 ml/min), de recirculació (250 ml/min) i de purga (0.28 ml/min).
- Humitejar amb aigua neta el mòdul CellFlo.
- Muntar completament el circuit de perfusió incloent tots els tubs, connectors, ampolles i el mòdul CellFlo, és a dir, els circuits de recirculació, retroneteja, eliminació del medi exhaurit i purga cel·lular. No collar gaire les connexions d'entrades laterals perquè circuli bé el vapor i s'equilibrin pressions.
- Envoltar les parts finals del circuit de perfusió (paper d'embolicar i d'alumini), estant segurs de deixar oberts els connectors ràpids (Keck, Quick Disconnect Adapters, H-06841-50 i H-06841-54).
- Autoclavar el circuit complet de perfusió a 121 °C durant 30 minuts. No utilitzar mai un cicle amb la temperatura superior a 124 °C.
- Refredar a temperatura ambient i collar molt bé totes les connexions per assegurar un tancament adequat.
- Revisar que totes les connexions tubulars estan collades i tancar els connectors del final del circuit de perfusió.

Seguidament es descriu la regeneració i el tractament d'un mòdul CellFlo que ja ha estat utilitzat almenys una vegada. Després de cada perfusió, el cartutx es recupera rentant-lo amb abundant solució aquosa de detergent sense fosfats 0.5% (p/v). A continuació, el mòdul CellFlo es posa en remull tota la nit en una solució aquosa que conté EDTA (Sigma, ED2P) al 1% (p/v) i tripsina (Sigma, T-7409) al 2% (p/v). El cartutx regenerat es renta amb grans quantitats d'aigua Milli Q i, finalment, s'asseca amb nitrogen gas. Quan aquest mòdul es fa servir en una altra operació en perfusió, abans de tot es recobreix durant tota la nit amb una solució de polietilenglicol al 1.5% (p/v) (Sigma, P-2139) per reduir l'obturació dels porus, i així perllongar el temps de perfusió.

8.8.3.3. Preparació del bioreactor.

La preparació del Biostat MCD per a cultius en perfusió segueix un protocol molt semblant al descrit a l'apartat 8.8.1.2. per a l'operació en discontinu, encara que per a la nova configuració s'han de tenir en compte els nous elements descrits anteriorment.

Un vegada es disposa del circuit de perfusió autoclavat es connecta amb la resta de l'equip experimental estèril a l'interior de la cambra de flux laminar vertical amb connectors ràpids.

Al finalitzar el procés d'autoclavat del bioreactor s'obren les entrades i sortides de gasos menys la del microdifusor, que no s'obre fins que es fa necessari. S'adapten els tub-capçals d'entrades i sortides de medi a les bombes corresponents. S'uneixen estèrilment al

mundatge les ampolles amb medi fresc. Totes les operacions de canvi de medi es realitzen estèrilment a la cambra de flux laminar vertical.

La mescla de gasos es realitza a la DCU que té l'estació de gasos amb el controlador tipus *pO₂ Gas-Flow*. A la funció de control *Gas-Flow Ratio* de la DCU es consigna el cabal de la mescla de gasos d'aire i N₂ a 1000 ml/min (TOTAL = 0.85 slpm i CONTR = ratio) i el de CO₂ a 100 ml/min per a la membrana tubular de silicona. El manoreductor de sobrepressió s'ajusta a 0.5 bars. Quan comença la perfusió (encesa de tots els circuits descrits a l'operació en continu amb perfusió) es desconnecta el bombolleig per membrana de silicona i s'activa el microdifusor, com a nou sistema d'aeració. A la funció de control *Gas-Flow Ratio* de la DCU es consigna el cabal de la mescla de gasos d'aire i N₂ a 200 ml/min (TOTAL = 0.20 slpm i CONTR = ratio) i el de CO₂ a 33 ml/min.

8.9. MÈTODES ANALÍTICS.

8.9.1. Recompte cel·lular.

Per tal de conèixer de manera directa el nombre de cèl·lules viables, mortes, totals i el percentatge de viabilitat que presenta el cultiu, es porta a terme un recompte d'aquest a 100 augments mitjançant un microscopi invertit de contrast de fases (Nikon, TMS) i un hemacitòmetre (Improved Neubauer Chamber, Brand). L'hemacitòmetre és un portaobjectes amb quatre camps o cavitats quadrades on hi ha dibuixades unes xarxes de 4x4 quadrats microscòpics. A cada camp hi cap un volum de mostra conegut, i els setze quadres dibuixats faciliten el recompte de les cèl·lules presents a cada camp.

Per tal de poder diferenciar les cèl·lules viables de les mortes s'utilitza una tinció amb tripà blau (Sigma, T-8154). Aquest colorant només penetra a l'interior de les cèl·lules mortes i els hi dona un color blavós al ser observades amb el microscopi invertit. Per contra, les cèl·lules viables es diferencien perfectament de les mortes pel seu color blanc brillant (Freshney, 1994). La solució comercial es troba inicialment al 0.4%, per això cal diluir-la a la meitat amb una solució de NaCl 0.9%, i filtrar la solució resultant amb un filtre de 0.22 µm de diàmetre de porus.

Per realitzar l'observació, 75 µl de la mostra del cultiu es dilueixen a la meitat amb 75 µl de tripà blau al 0.2% (v/v) en NaCl 0.9% (p/v). Una gota de la dilució es diposita a la zona de recompte de l'hemacitòmetre i es cobreix amb un cobreobjectes. A continuació, es realitza el recompte de cèl·lules viables i mortes en cadascun dels quatre camps. Els dos valors superior i inferior obtinguts es rebutgen, mentre que els altres dos s'omitjanen.

Concentració cel·lular

El càlcul de la concentració de cèl·lules present al cultiu es realitza mitjançant la següent expressió (Eq. 8.3):

$$[\text{Cèl·lules/ml}] = \frac{n_1 + n_2}{d \times V_{camp}} \times m \quad (\text{Eq. 8.3})$$

on n_1 i n_2 són el nombre de cèl·lules comptades en els dos camps seleccionats, m és el nombre de camps comptats i té un valor de 2, d és la dilució amb tripà blau realitzada i val 0.5, i V_{camp} és el volum de mostra present a cada camp i té un valor de 10^{-4} ml. D'aquesta manera l'expressió queda reduïda a l'equació 8.4:

$$[\text{Cèl·lules/ml}] = (n_1 + n_2) \times 10^4 \quad (\text{Eq. 8.4})$$

Aquesta expressió és aplicable a les cèl·lules viables i mortes.

Viabilitat cel·lular

Per obtenir el percentatge de viabilitat cal calcular prèviament el nombre total de cèl·lules (suma de les viables i les mortes) i, posteriorment, aplicar la següent expressió (Eq. 8.5):

$$\% \text{ Viabilitat} = \frac{\text{Concentració cèl·lules viables}}{\text{Concentració cèl·lules totals}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8.5})$$

8.9.2. Determinació de la concentració de substrats i productes cel·lulars.

Les mostres dels cultius de diferents experiments, després de fer el recompte cel·lular, se centrifuguen a 1700 g durant 5 minuts. El sobrenedant es guarda congelat a -20 °C per a les posteriors anàlisis de substrats, metabolits cel·lulars i anticòs.

8.9.2.1. Anàlisi de glucosa i lactat.

Les concentracions de glucosa i lactat es mesuren amb un analitzador automàtic de glucosa i lactat YSI (Yellow Springs Instrument, 2700 Select). Aquest aparell disposa d'un elèctrode format per una fina membrana amb enzims immobilitzats que envolta un ànode de platí. Les molècules de glucosa o L-lactat presents a la mostra difonen a través de la

membrana, i pateixen una transformació enzimàtica per acció de la glucosa oxidasa i la lactat oxidasa, aquestes reaccions alliberen electrons que són finalment detectats per l'elèctrode. La intensitat dels senyals elèctrics produïts és proporcional a la concentració de cadascun dels dos substrats. Aquesta mesura elèctrica no es veu afectada pel color, terbolesa, densitat o temperatura de la mostra, i només precisa que l'alíquota presa per a la mesura sigui filtrada o centrifugada amb anterioritat per tal d'eliminar les cèl·lules o impureses que puguin obstruir la membrana.

L'analitzador pren 50 µl de cada mostra i proporciona els valors de concentració de glucosa i lactat en (g/l), amb un error aproximat de ± 0.1 g/l. El rang de concentracions que pot mesurar l'aparell oscil·la de 0.05 a 20.0 g/l per a la glucosa i 0.05 a 2.00 g/l per al lactat. Quan les mostres estan excessivament concentrades és necessari diluir-les amb aigua ultrapura fins que les mesures entren en el rang de mesura. L'aparell requereix les següents solucions pel seu funcionament:

| Solució patró | |
|------------------------------------|----------|
| K ₂ H ₂ EDTA | 0.159 g |
| Àcid benzoic | 0.263 g |
| Glucosa | 0.45 g |
| L-Lactat | 0.1125 g |
| Aigua ultrapura | 250 ml |

| Solució Tampó | |
|--|----------|
| K ₂ H ₂ EDTA | 0.572 g |
| Benzoat sòdic | 0.948 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 2.028 g |
| NaCl | 1 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 16.2 g |
| Sulfat de gentamicina | 0.0076 g |
| Aigua ultrapura | 1 litre |

Les dues solucions es filtren al buit amb una membrana d'acetat de cel·lulosa de 0.45 µm de diàmetre de porus i es renoven una vegada a la setmana.

8.9.2.2. Anàlisi d'aminoàcids i amoni.

L'anàlisi de la concentració d'aminoàcids i amoni es realitza per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), mitjançant una derivatització prèvia dels aminoàcids (Mètode de AccQ-Tag, Waters), prèvia a la seva separació. La majoria dels aminoàcids són molècules sense grups cromòfors i amb uns radicals de diferent naturalesa. Cal afegir als aminoàcids alguna característica que permeti detectar-los amb suficient sensibilitat. Això s'aconsegueix mitjançant una reacció de derivatització en què cadascun dels aminoàcids s'uneix a un reactiu que en permet la seva posterior detecció. Seguidament, els aminoàcids derivatitzats se separen per cromatografia de fase reversa i són detectats, ja que absorbeixen llum en la zona ultraviolada.

El material i reactius que s'utilitzen per a l'anàlisi d'aminoàcids i amoni són els següents:

- Cromatògraf Waters LC Module I Plus.
- Columna de fase reversa per a l'anàlisi d'aminoàcids (Waters, AccQ-Tag 150x3.9 mm, WAT052885).
- *AccQ-Fluor Reagent Kit* conté tres ampolles:
 - ✓ *Waters AccQ-Fluor Borate Buffer*.
 - ✓ *Waters AccQ-Fluor Reagent Powder*.
 - ✓ *Waters AccQ-Fluor Reagent Diluent*.
- Una solució patró de tots els aminoàcids i amoni de 0.1 mM i 1 mM de concentració, per poder efectuar els corresponents calibrats. A més, es preparen dues solucions patrons concentrades de Gln, Ala i Amm amb concentracions en el primer patró de 10, 5 i 10 mM i en el segon de 5, 2.5 i 5 mM respectivament.

Per separar els aminoàcids i l'amoni es fan servir dos eluents diferents:

- ELUENT A: Acetat sòdic/ Àcid EtilenDiaminoTetraAcètic (EDTA)/ TriEtilAmina (TEA). Es preparen 19.0512 g d'acetat sòdic + 1.107 mg de EDTA + 2.35 ml de TEA en 1000 ml d'aigua ultrapura. Quan està tot ben dissolt s'ajusta el pH a 5.05 amb àcid ortofosfòric. A continuació es microfiltra la solució amb un filtre d'acetat de cel·lulosa de 0.45 µm de diàmetre de porus i es desgasa.
- ELUENT B: Acetonitril 60% (v/v). Es preparen 600 ml d'acetonitril + 400 ml d'aigua ultrapura. A continuació es microfiltra la solució de la mateixa manera que l'eluent A i es desgasa.

Les mostres es filtren amb filtres d'acetat de cel·lulosa amb un diàmetre de porus de 0.45 µm.

Mètode d'anàlisi: La detecció es realitza a 254 nm per a tots els aminoàcids i l'amoni. La temperatura del forn és de 37 °C. Aquest mètode permet separar tots els aminoàcids i amoni en 45-50 minuts donant el següent ordre d'elució:

Asp-Ser-Glu-Gly-Gln-His-Amm-Arg-Thr-Ala-Pro-Cys-Tyr-Val-Met-Lys-Ile-Leu-Phe-Trp.

8.9.2.3. Determinació de la concentració de l'anticòs monoclonal.

La concentració de l'anticòs monoclonal es determina mitjançant la tècnica d'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), (Butler i col., 1978; Nellen, 1992). Concretament s'utilitza un ELISA indirecte; aquest mètode consisteix en fixar a un suport sòlid un anticòs

(anti-IgG₃) que reconegui l'anticòs problema (IgG₃), i utilitzar un segon anticòs que reconegui també l'anticòs problema, però que porti lligat un enzim que catalitzi una reacció colorimètrica. La intensitat de color detectada és directament proporcional (dins d'un interval) a la concentració de l'anticòs problema.

Els reactius i materials utilitzats són els següents:

- Plaques de poliestirè de 96 pous de fons pla per a l'ELISA (NUNC, Maxisorp 442404).
- Pipeta multicanal (BRAND, Transferpette-12).
- Espectrofotòmetre automàtic per a plaques de 96 pous (Whitakker, Anthos 2001).
- Anticossos:
 - ✓ Anti-IgG₃ (The Binding Site, Sheep antimouse IgG₃ affinity purified, AU276). Es dilueix amb tampó de recobriment (1:200) fins a una concentració de 5 µg/ml, es fan alíquotes de 5 ml i es guarda congelat a -20 °C.
 - ✓ Anti-IgG₃-Enz (The Binding Site, Sheep antimouse IgG₃ affinity purified peroxidase conjugase, AP276). Ve subministrat a una concentració de 1 mg/ml. Es conserva a 4 °C.
 - ✓ IgG₃ patró (The Binding Site, Monoclonal antihuman IgG₃, MCO07). Isotip IgG₃ de ratolí. Ve subministrat a una concentració de 0.2 mg/ml i es conserva a 4 °C.

Cal preparar també les següents solucions:

Tampó PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 0.1 M, pH 7.4

| | |
|--|---------|
| NaCl | 8 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 2.8 g |
| KCl | 0.2 g |
| Aigua ultrapura | 1 litre |

Tampó de recobriment:

| | |
|---------------------------------|-----------------------|
| Na ₂ CO ₃ | 1.59 g |
| NaHCO ₃ | 2.93 g |
| Timerosal (Serva, 11339) | 0.1 ml (0.01 % (v/v)) |
| Aigua ultrapura | 1 litre |

Tampó de rentat:

| | |
|-------------------------|-----------------------|
| Tween-20 (Serva, 37470) | 0.5 ml (0.05 % (v/v)) |
| Timerosal | 0.1 ml (0.01 % (v/v)) |
| PBS | 1 litre |

Tampó de bloqueig:

Albúmina (BSA) 30 g (3 % (p/v))
(Pentex, 82-045-1, fracció V sense proteases)

Tampó de rentat 1 litre

Tampó de dilució:

Albúmina (BSA) 10 g (1 % (p/v))

Tampó de rentat 1 litre

Solució del substrat (Pierce, Immunopure Microwell Peroxidase substrate kit, 34021):

Solució I: tetrametilbenzidina (TMB) 0.4 g/l.

Solució II: H₂O₂ 0.02% en Àcid cítric.

H₃PO₄ 1 M

Procediment:

- Recobriments de les plaques: Es descongela l'anti-IgG₃ i es dilueix amb tampó de recobriments fins a una concentració de 1 µg/ml. S'afegeixen 100 µl per pou i es deixa la placa tota la nit (16-18h) a 4 °C.
- Rentat: Es renta la placa tres vegades amb tampó de rentat per eliminar l'anticòs que no s'ha enganxat. Per realitzar el rentat es buida el contingut dels pous invertint la placa i s'escorre bé aquesta picant sobre el paper de filtre. S'omple un recipient amb solució de rentat i se submergeix la placa en la solució per tal que s'omplin tots els pous i es deixa fora del recipient 1 minut. Es repeteix el procés tres vegades.
- Bloqueig: Per evitar la unió d'altres anticòs, la paret del pou es bloqueja amb una proteïna inert com l'albúmina. S'afegeixen 100 µl de tampó de bloqueig a cada pou i s'incuba la placa 1 hora a 30 °C dins d'una cambra humida.
- Rentat: Es repeteix el mateix procediment de rentat descrit anteriorment.
- Preparació de les dilucions dels patrons i les mostres:
 - ✓ Corba patró: Es fa una dilució 1:1000 del patró (IgG₃) amb tampó de dilució i a continuació es dilueix fins a 40 ng/ml. A partir d'aquesta dilució es preparen les concentracions: 15, 12.5, 10, 7.5, 6.25, 5, 2.5 i 1.25 ng/ml.

- ✓ Mostres: Per tal que les mostres entrin en el rang de concentracions de la recta patró es dilueixen amb tampó de dilució en proporcions diferents depenent del temps del cultiu en què s'ha tret cada mostra, i per tant del nivell d'anticòs que en principi cal esperar.
- Addició dels patrons i de les mostres:
 - ✓ S'afegeixen 100 µl de tampó de dilució a tots els pous excepte els de les columnes 1 i 2, i els de la fila A₃-A₁₀ i E₃-E₁₀. Les columnes 10 i 11 s'utilitzen com a blanc (Figura 8.14).
 - ✓ Patrons: S'afegeixen 100 µl de cada concentració als pous de les columnes 1 i 2 tal com s'indica a la Figura 8.14, d'aquesta manera es fa un duplicat de cada concentració.
 - ✓ Mostres: S'afegeixen 200 µl de cada mostra a les files A₃-A₁₀ i E₃-E₁₀ tal com s'indica a la Figura 8.14. Cada mostra es mesurarà per duplicat. A continuació es procedeix a fer tres dilucions dobles de cada mostra. Primer es transfereixen 100 µl dels 8 pous de la fila A que contenen les mostres a la fila B. El contingut de cada pou s'homogeneïtza amb la micropipeta. Aquesta operació es repeteix pels 8 pous de la fila C i D. Els últims 100 µl de la fila D es descarten. Per a les mostres que estan a la fila E se segueix el mateix procediment. D'aquesta manera de cada mostra hi haurà 4 concentracions diferents i molt probablement alguna d'aquestes concentracions es trobarà dins del rang de mesura.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------|---|----------|----------|----------|----------|---|---|---|----|-------|----|
| A | 15 ng/ml | | MOSTRA 1 | MOSTRA 3 | MOSTRA 5 | MOSTRA 7 | | | | | BLANC | |
| B | 12.5 ng/ml | | | | | | | | | | BLANC | |
| C | 10 ng/ml | | | | | | | | | | BLANC | |
| D | 7.5 ng/ml | | | | | | | | | | BLANC | |
| E | 6.25 ng/ml | | MOSTRA 2 | MOSTRA 4 | MOSTRA 6 | MOSTRA 8 | | | | | BLANC | |
| F | 5 ng/ml | | | | | | | | | | BLANC | |
| G | 2.5 ng/ml | | | | | | | | | | BLANC | |
| H | 1.25 ng/ml | | | | | | | | | | BLANC | |

Figura 8.14. Distribució de les mostres i patrons en les plaques de 96 pous de l'assaig ELISA.

- Rentat: Es repeteix el mateix procediment de rentat descrit anteriorment.
- Addició de l'anticòs conjugat a l'enzim peroxidasa (anti-IgG₃-Enz). Es dilueix l'anti-IgG₃-Peroxidasa amb tampó de dilució fins una concentració de 300 ng/ml. S'afegeixen 100 µl per pou i s'incuba la placa 1 hora a 30 °C en una cambra humida.

- **Rentat:** Es repeteix el mateix procediment de rentat descrit anteriorment.
- **Addició del substrat:** Es barregen volums iguals de solució I (TMB) i solució II (H₂O₂), just en el moment abans de ser utilitzades. S'afegeixen 100 µl a cada pou i s'incuba la placa durant 30 minuts a temperatura ambient i protegida de la llum amb paper d'alumini. La peroxidasa conjugada a l'anticòs catalitza la transferència d'electrons del TMB al peròxid d'hidrogen; aquesta reacció forma un producte amb color, la intensitat del qual és proporcional a la concentració de l'anticòs present.
- **Lectura:** S'atura la reacció afegint 100 µl d'àcid fosfòric 1 M a cada pou. Seguidament, es llegeix el color groc resultant a 450 nm, en l'espectrofotòmetre automàtic. A partir de la recta de calibratge obtinguda amb les solucions patró el programa de l'espectrofotòmetre determina automàticament la concentració de les mostres problema. Aquest mètode té un error del 10%. El programa utilitzat en l'espectrofotòmetre automàtic (Whitakker, Anthos 2001) per a la lectura de plaques de 96 pous és el següent:
 - ✓ *Measurement filter 450nm*
 - ✓ *Blankmode: Average of individual blank positions*
 - ✓ *Method: Quantitative evaluation, standard curve, concentration*
 - ✓ *Plate layout: Autoreplicates 2 wells per sample horizontal*
 - ✓ *Units of concentration: ng/ml*
 - ✓ *Curve-fit mode: linear/linear*
 - ✓ *Shaking: 1 sec, mode 1*

8.10. MESURA D'IMPEDÀNCIA ELÈCTRICA.

Les eines emprades per al desenvolupament i validació de les mesures d'impedància es descriuen com una entitat diferent ja que en aquesta metodologia s'utilitzen vàries línies cel·lulars, molt diferents a la descrita anteriorment, així com d'altres procediments operacionals i analítics.

8.10.1. Equipament per a la mesura d'impedància elèctrica.

Per realitzar les mesures d'impedància elèctrica en les diferents suspensions cel·lulars i fermentacions s'ha disposat d'un analitzador d'impedàncies comercial (HP4192A), una etapa frontal remota, una configuració que conté els elèctrodes i un ordinador portàtil amb software propi incorporat que adquireix i tracta les dades. A continuació, es fa una descripció dels equips més importants del sistema de mesura.

8.10.1.1. HP4192A.

El HP4192A (Hewlett Packard) és un analitzador d'impedàncies comercial de grans prestacions que mesura un rang molt ampli de valors d'impedància (des de 0.1 m Ω fins a 1.3 M Ω) en un ampli marge de freqüències (de 5 Hz fins a 13 MHz). Pot fer les mesures, per exemple en un escombrat de freqüència, de forma automàtica i, a més a més, connectar-se amb un ordinador via bus i automatitzar les mesures des d'aquest. Bàsicament, l'instrument injecta un corrent entre els dos elèctrodes exteriors i mesura la caiguda de tensió entre els dos elèctrodes interiors. De la relació entre les dues variables s'obté el valor de la impedància.

L'analitzador d'impedàncies disposa de tres pantalles per presentar les mesures: una per a la freqüència a què està treballant i les altres dues per presentar les mesures que està fent des dels seus quatre terminals *UNKNOWN*. En la primera de les pantalles dedicades a les mesures pot presentar la impedància, l'admitància, la conductància o la capacitat, mentre que en la segona pot presentar la fase o la reactància.

8.10.1.2. Etapa frontal remota (*front-end*).

Els elèctrodes tenen una impedància diferent de zero ja que actuen a l'interior de la dissolució com transductors entre la corrent iònica i el flux d'electrons que passen pel circuit elèctric. En el sistema de mesura, la presència d'elèctrodes i cables d'extensió fa que les mesures realitzades amb instruments comercials de mesura d'impedància (HP4192A) tinguin notables errors (s'incrementa l'efecte de la impedància d'elèctrode) ja que no tenen prevista la seva presència. Per això, es fa necessària la utilització d'una etapa frontal remota o *front-end* amb una impedància d'entrada suficientment elevada per reduir l'efecte de la presència dels elèctrodes (Gersing, 1991), i poder fer les mesures de forma correcta.

L'etapa frontal remota enllaça el HP4192A amb la configuració del sistema, és a dir, amb els elèctrodes. Aquesta consisteix en un amplificador d'instrumentació (AI) de gran amplada de banda (250 MHz) i un refús al mode comú (CMRR) molt elevat, de l'ordre de 56 dB a 10 MHz, basat en dispositius que operen en mode corrent (MAX436). És necessari utilitzar cables coaxials entre l'etapa frontal i els elèctrodes per evitar les interferències (*crosstalk*) entre la injecció de corrent i la detecció de tensió (Bragós i col., 1996).

8.10.1.3. Ordinador i programa de gestió.

El mesurador d'impedàncies HP4192A està connectat a un ordinador portàtil Compaq Contura 410C M350 (PC486, 75 MHz) i es controla mitjançant el bus IEEE488. Aquest ordinador incorpora un software desenvolupat al Departament d'Enginyeria Electrònica de la

UPC per controlar les mesures realitzades amb l'analitzador HP4192A. Aquest software és una aplicació sobre LabWindows/CVI 3.0.1, de National Instruments descrit a l'apartat 8.4.2. L'executable resultant corre sobre l'entorn Windows 3.1. En aquesta aplicació es poden dur a terme les funcions usuals de configuració, gestió de dades i visualització. A més a més, permet realitzar:

- mesures automàtiques en intervals programables pel seguiment de mesures canviants en el temps.
- amonitjament d'un nombre programable d'escombrats de freqüència consecutius.
- calibratge en línia de les mesures amb un mètode simple a una referència.
- calibratge opcional a posteriori de les mesures.
- representació gràfica de totes les combinacions: cartesiana - polar, impedància –admitància – resistivitat - permitivitat vers la freqüència, o bé el diagrama d'Argand (part imaginària vers part real) de les magnituds anteriors.

8.10.1.4. Configuració del sistema per a l'obtenció del senyal elèctric.

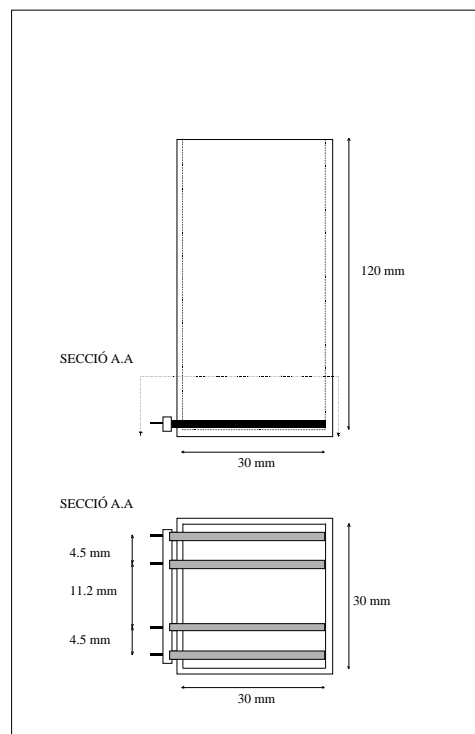


Figura 8.15. Esquema amb les dimensions de la cubeta estàtica.

La configuració del sistema de mesura realitza la mesura d'impedància a quatre fils o elèctrodes (cubeta estàtica). Com ja s'ha dit, la impedància dels elèctrodes provoca un error

en la mesura de la impedància de la solució. Per tant, si es fa la mesura a quatre fils (s'utilitza dos elèctrodes per injectar el corrent i dos per mesurar la tensió) la magnitud de l'error serà molt petita (Harris i col., 1987; Rosell i col., 1988; Kijlstra i col., 1994). En canvi, si es fes a dos fils (la corrent s'injecta pels mateixos elèctrodes en què es mesura la tensió) la impedància mesurada seria la suma de la impedància de la solució a mesurar més dos vegades la impedància de l'elèctrode, pel que la magnitud de l'error en aquest cas seria molt gran. La cubeta estàtica és la configuració que s'utilitza per realitzar mesures fora de línia. Consisteix en un petit prisma de metacrilat de dimensions 30x30x120 mm (Figura 8.15). Els elèctrodes són quatre barres d'acer inoxidable de 2 mm de diàmetre i 30 mm de llargada situades al fons de la cel·la de mesura. Els dos elèctrodes dels extrems són pels que s'introdueix el corrent i els dos elèctrodes centrals són pels que es mesura la tensió.

8.10.2. Obtenció i tractament de les dades d'impedància.

8.10.2.1. Obtenció.

Les mesures d'impedància es realitzen amb l'analitzador d'impedàncies HP4192A en el marge de freqüències de la dispersió . Concretament es fan escombrats de freqüència entre 10 kHz i 10 MHz. Aquests escombrats es realitzen amb 31 punts de freqüències espaiats logarímicament (10 punts per dècada). Cada 10 escombrats consecutius s'omitjanen i la mitjana es guarda en un fitxer amb un valor d'impedància per a cada freqüència. Aquesta mitjana es realitza per filtrar l'efecte de les variacions temporals de la impedància dins d'un escombrat.

8.10.2.2. Mètode de calibratge en línia.

Per corregir la constant de cel·la i la resposta de l'amplificador a cada freqüència s'utilitza el mètode de calibratge en línia de les mesures amb un mètode simple, a una referència. Aquest mètode utilitza el valor d'impedància a cada freqüència (de 10 kHz fins a 10 MHz) de la solució referència (p. ex. la solució inicial, que no presenta relaxació) per corregir la resta de corbes de relaxació mesurades. L'aplicació sobre LabWindows/CVI permet el calibratge automàtic en línia de les mesures d'impedància. Aquest mètode no corregeix els errors sistemàtics dependents de la càrrega, és a dir, aquells errors que varien segons el nivell d'impedància que s'està mesurant.

8.10.2.3. Mètode de calibratge a tres referències.

El mètode de calibratge a tres referències s'ha utilitzat per corregir els errors dependents de la càrrega. El mètode s'obté d'una fórmula general de calibratge de transductors per a números reals (Bolk, 1985) i la modificació d'aquesta per a números

complexes (Bragós i col., 1994). Aquest mètode utilitza el valor d'impedància de tres solucions salines per determinar els valors dels tres coeficients complexos a cada freqüència, (Eq. 8.6). Els valors d'impedància a baixa freqüència (10 kHz) en què s'efectuen aquestes tres referències són: un superior al valor més alt, un valor intermedi i un inferior al valor més baix del total de mesures realitzades. L'aplicació sobre LabWindows CVI permet el calibratge a posteriori de les mesures d'impedància. La fórmula de calibratge és :

$$Z_c = C_0(\omega) + \frac{C_1(\omega) Z_m(\omega)}{1 + C_2(\omega) Z_m(\omega)} \quad (\text{Eq. 8.6})$$

on

Z_c : impedància corregida, .

Z_m : impedància mesurada, .

ω : freqüència angular, Hz.

C_0 , C_1 i C_2 : coeficients obtinguts a cada freqüència mitjançant la mesura de tres solucions salines de referència.

Donat que l'adquisició de referències pot ser feta en la cel·la de mesura, els factors geomètrics i els efectes d'elèctrode poden ser corregits. El sistema de mesura junt amb el mètode de calibratge permet la mesura de relaxacions de fins al 0.1% en tota l'amplada de la banda freqüencial.

8.10.3. Procediment experimental per a la mesura d'impedància.

Per validar el mètode de mesura s'utilitzen diferents línies cel·lulars. A continuació es detalla el procediment experimental seguit per cadascuna d'elles en aquest treball.

8.10.3.1. Línies cel·lulars i manteniment.

En aquesta part del treball s'utilitzen per realitzar les mesures d'impedància els llevats *Candida rugosa* i *Saccharomyces cerevisiae*, i els bacteris *Rhodobacter capsulata* i *Escherichia coli*, així com les cèl·lules d'hibridoma KB-26.5.

Les cèl·lules d'hibridoma es mantenen i es resembren segons el que s'ha descrit a l'apartat 8.7.3. Els microorganismes es mantenen en plaques de Petri que contenen 20 ml de medi solidificat de composició: 15 g/l d'agar-agar, 10 g/l d'extracte de llevat i 20 g/l de peptona bacteriològica. Després de 24 hores d'incubació a 37 °C, es conserven a 4 °C. La ressembla s'efectua cada mes. A més a més, de cada soca es guarden cultius estoc glicerinat

en medi de cultiu en què s'afegeixen 20% de glicerol pels llevats i 15% pels bacteris en vials de 5 ml i es conserven congelats a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.10.3.2. Medis de cultiu.

Totes les línies cel·lulars es cultiven en medis rics. Per al llevat *C.rugosa* i per al bacteri *R.capsulata* s'utilitza el mateix medi: 290A. El llevat *S.cerevisiae* es fa créixer en medi YPEG2%, i el bacteri *E.coli* en medi LB modificat. L'hibridoma KB-26.5 es cultiva en el medi base DMEM, descrita la seva preparació a l'apartat 8.6.1.

Medi 290A

- 10 g/l Peptona bacteriològica.
- 5 g/l Extracte de llevat.
- 10 g/l NaCl.
- 0.375 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.
- 15 g/l Glucosa.

Medi YPEG2%

- 10 g/l Extracte de llevat.
- 20 g/l Peptona bacteriològica.
- 20 g/l Glucosa.

Medi LB modificat.

- 5 g/l Extracte de llevat.
- 10 g/l Peptona bacteriològica.
- 15 g/l Glucosa.
- 5 g/l NaCl.

Els components dels medis per a llevats i bacteris es dissolen en aigua destil·lada, s'ajusten entre 6.5 i 7.0 unitats de pH i s'esterilitzen durant 20 minuts a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1.2 atm en un autoclau.

8.10.3.3. Preparació dels cultius.

En el cas de les cèl·lules animals aquesta preparació ja ha estat descrita a l'apartat 8.7.3. Els cultius de microorganismes es fan créixer amb 100 ml de medi en un matràs d'Erlenmeyer de 500 ml de volum amb deflectors. S'inoculen a partir de les plaques on es mantenen els diferents cultius de microorganismes i es fan créixer 18 hores a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un agitador orbital a 300 rpm.

8.10.3.4. Procediment amb la cubeta estàtica.

En l'estudi bàsic fet a la cubeta estàtica s'utilitza per fer les mesures elèctriques les cinc línies cel·lulars: *E.coli*, *R.capsulata*, *C.rugosa*, *S.cerevisiae* i l'hibridoma KB-26.5. Els brous de cultiu de les fermentacions o dels inòculs se centrifuguen a 6000 g durant 10 minuts a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la centrífuga Beckman per a les 4 primeres soques, en canvi per l'hibridoma KB-

26.5 se centrifuguen a 1000 g durant 10 minuts a 4 °C en la mateixa centrífuga. Es retira el líquid sobrenedant i el sediment es torna a resuspendre amb solució salina de NaCl (0.9%) fins a aconseguir la concentració cel·lular desitjada.

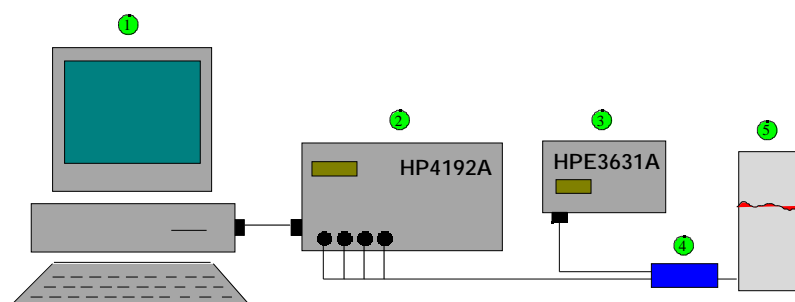


Figura 8.16. Esquema del muntatge experimental amb la cubeta estàtica: (1) Ordinador portàtil, (2) Analitzador d'impedàncies HP4192A, (3) Font d'alimentació HPE3631A, (4) front-end i (5) Cubeta estàtica.

Inicialment s'agafa 40 ml de mostra i s'introdueix en la cel·la del sistema de mesura (Figura 8.16). La suspensió s'homogeneïtza i es manté a 26 °C de temperatura per realitzar els escombrats de freqüències en condicions estables. Un cop finalitza la mesura d'impedància de la mostra inicial es retira amb pipeta de 20 ml de mostra de dins la cel·la i s'afegeix amb pipeta de 20 ml de solució salina de NaCl (0.9%), s'homogeneïtza, es manté la temperatura constant a 26 °C, i es torna a realitzar la mesura d'aquesta dilució. Així successivament fins que la darrera dilució presenta una corba de relaxació inferior al 0.1% en l'amplada de la banda freqüencial. De cada porció de 20 ml que s'extreu de la cel·la s'agafa una alíquota de 10 ml per fer el pes sec o, en el cas de les cèl·lules animals, per realitzar el recompte cel·lular al microscopi de la mostra mesurada elèctricament. Un cop realitzada la seqüència de dilucions, s'observa els valors d'impedància a 10 kHz de tots els fitxers obtinguts i es determina en quins valors a baixa freqüència s'ha de passar les tres referències salines per obtenir les corbes de relaxació corregides.

8.10.4. Determinació del pes sec.

Aquest mètode analític, utilitzat pels bacteris i pels llevats, consisteix en centrifugar (6000 g, durant 10 min) un volum determinat de mostra de cultiu o suspensió cel·lular (10ml) i després tornar a suspendre el sediment format amb una solució salina de NaCl (0.9%), tot seguit filtrar la suspensió al buit a través d'una membrana de fibra de vidre (Whatman GF/F) de 0.45 µm de mida de porus. Seguidament, esbandir el filtre amb aigua destil·lada i col·locar en una estufa a 105 °C fins a pes constant (entre 18 i 24 hores).