

Cultivo de Células Animales Sincronizadas en Biorreactores como un Nuevo Modo de Operación para Optimizar la Producción de Proteínas Recombinantes

Elena Mendoza¹; Vanessa Hernández² y José A. Serrato*¹

*¹Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Departamento de Bioquímica. Calzada de Tlalpan 4502 Col. Sección XVI C.P 14080, Tlalpan D.F. ² Instituto de Biotecnología, UNAM. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62210. *Author para correspondencia: jaserrato@iner.gob.mx*

RESUMEN

La ingeniería del cultivo de células animales representa hoy día la tecnología estándar para la producción de múltiples proteínas recombinantes terapéuticas. No obstante, aun es necesario realizar investigación para optimizar los procesos de producción, con la finalidad de abatir el costo de dichos medicamentos. La investigación en el área se centra en aumentar la cantidad y calidad de dichas proteínas mediante cultivos celulares convencionales, sin tomar en cuenta que dicho acercamiento no permite identificar procesos específicos de determinada fase del ciclo celular que sean potencialmente relevantes para mejorar la cantidad o calidad de las proteínas recombinantes producidas. En el presente trabajo se hace una revisión de estudios recientes que muestran el cultivo de células animales sincronizadas como un nuevo modo de operación para el estudio detallado, en las diferentes fases del ciclo celular, de los múltiples procesos celulares implicados en la producción de proteínas recombinantes. Se muestra que la elutriación centrífuga a contracorriente es el método de sincronización seleccionado para dicho propósito, el cual acoplado a sistemas de cultivo en biorreactores permite obtener poblaciones celulares altamente sincronizadas, bajo condiciones de cultivo controladas y a concentraciones celulares que permiten múltiples muestreos y determinaciones analíticas. Mediante dicho acercamiento se han identificado diferencias en el comportamiento cinético y metabólico de la población celular, en contraste con lo observado hasta la fecha en cultivos convencionales no sincronizados. Así, el cultivo de células animales sincronizadas en biorreactores podría representar en el futuro una estrategia para el estudio y optimización de los procesos de producción de proteínas recombinantes.

Palabras clave: Sincronización celular, Ciclo celular, Elutriación centrífuga, Cultivo celular, Células animales

ABSTRACT

Nowadays, cell culture of animal cells is the standard technology for the production of a large number of therapeutic proteins. As result of the interest to optimize the production of recombinant proteins generated by cell culture, research in the field has been focus on the improvement of quantity and quality of such proteins using cell cultures whose population, however, is highly segregated in the different phases of the cell cycle. As consequence, the results observed are the sum of all the processes involved in protein production during all phases of the cell cycle. Recent literature shows that performing synchronized animal cell cultures represents a novel strategy to study, through each of the cell cycle phases, the contribution of all the processes implicated in recombinant protein production. The aim of the present article is to review the state of the art in synchronized culture of animal cells that could represent a strategy to optimize the production of recombinant proteins in the near future.

Key words: cell synchronization, cell cycle, centrifugal elutriation, cell culture, animal cells

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas tres décadas ha habido avances sustanciales en la ingeniería del cultivo de células animales a nivel tal que es la tecnología estándar para la producción de un número importante de proteínas recombinantes de uso terapéutico, principalmente anticuerpos monoclonales (Ozturk, 2006). En la actualidad, la investigación en el campo se ha centrado en optimizar la cantidad (Lara et al., 2006) y más recientemente la calidad de las proteínas recombinantes producidas (Du et al., 2014; Hossler, 2012). Tradicionalmente, para el estudio y optimización de la producción de proteínas recombinantes se emplean cultivos que son altamente heterogéneos con respecto al ciclo celular del ente biológico. Lo anterior se explica por la naturaleza proliferante de las líneas celulares que se utilizan en cultivo celular. Si bien durante la etapa de crecimiento exponencial de un cultivo convencional las células se encuentran en crecimiento balanceado, la población está altamente segregada en las diferentes fases del ciclo

celular, por tanto, los resultados obtenidos no proporcionan información respecto del estado fisiológico y metabólico de las células durante su progresión en las diferentes fases del ciclo celular. La realización de cultivos homogéneos con respecto a la población celular y bajo condiciones de cultivo controladas permite conocer, en las diferentes fases del ciclo celular, la contribución de múltiples procesos como la regulación y expresión génica, la secreción y el patrón de glicosilación, etc. implicados en la producción de proteínas, con la finalidad de optimizar los proceso de producción de proteínas recombinantes. El presente trabajo hace una revisión de estudios recientes de cultivo de células animales sincronizadas en biorreactores como un nuevo modo de operación en ingeniería del cultivo celular y que puede representar en el futuro una estrategia para optimizar los procesos de producción de proteínas recombinantes.

CICLO CELULAR

El ciclo celular es un proceso iterativo en el

que una célula da origen a dos células idénticas; se divide en cuatro fases en virtud de la especificidad de los procesos celulares que se llevan a cabo en cada una: fase G1, fase S (síntesis de ácidos nucleicos), fase G2 y fase M (mitosis) (Israels & Israels, 2001). Durante la fase G1 se ha observado que la célula aumenta su masa y produce grandes cantidades de proteína y ARN. Durante la fase G1 temprana se presenta una acumulación de proteína tres a cinco veces mayor que en el resto de la fase, además de un gasto energético considerable que es necesario para transitar satisfactoriamente a la fase S (Kromenaker & Srienc, 1991). Durante la fase S se lleva a cabo principalmente la replicación de ADN, los daños al mismo son reparados y es la fase en donde se asegura que el material genético se ha duplicado una sola vez. En esta fase la célula está provista del doble de proteínas nucleares y no presenta un incremento neto en la producción de proteína debido a los procesos de secreción y degradación. La fase G2 es una segunda fase de crecimiento en donde continúa la síntesis de proteínas y ARN, la célula sintetiza las proteínas necesarias para la segregación cromosómica y la división celular durante la mitosis, por tanto se convierte en una célula diploide y se observa un cambio en la estructura celular que indica el principio de su división. Durante la fase M la célula experimenta dos procesos importantes, el primero de ellos es la mitosis, en donde las cromátidas hermanas se separan y segregan en dos núcleos hijos idénticos cada uno de ellos con su propia copia de genoma. En el segundo proceso denominado citocinesis, la

maquinaria celular y el metabolismo están centrados en la reorganización de la infraestructura celular (Abu-Absi & Srienc, 2002), la célula finaliza su división dando origen a dos células idénticas (Alberts et al., 2008). En un ciclo típico de división celular de aproximadamente 24 horas, las fases G1, S, G2, y M durarían aproximadamente 10, 9, 4 y 1 horas respectivamente, sin embargo, dicho periodo varía y es específico para cada línea celular. Incluso, entre células del mismo linaje puede haber variaciones debido a cambios que se presentan durante la progresión del ciclo como es el caso de células que se arrestan en la fase G0 o bien por cambios en la duración de la fase G1 (Lloyd & Al-Rubeai, 1999). De acuerdo con lo arriba expuesto, es relevante poder estudiar de forma independiente los procesos que se llevan a cabo en cada una de las diferentes fases del ciclo celular con el objetivo de identificar aquellos directamente implicados en la cantidad y calidad de las proteínas recombinantes y poder utilizar dicha información para optimizar su proceso de producción.

SINCRONIZACIÓN CELULAR

Existe una tendencia natural de los cultivos celulares a crecer de forma no sincronizada, es decir, la población celular prolifera continuamente segregada en las diferentes fases del ciclo celular (**Fig. 1**). Lo anterior es resultado de las variaciones estocásticas en los tiempos de interdivisión durante el ciclo celular, como la heterogeneidad observada en la duración de la fase G1, que provocan que a través del tiempo un cultivo sincronizado pierda

la sincronía (Cooper, 2003). Un cultivo sincronizado se puede definir como aquel en donde se consigue que una población celular homogénea transite de manera uniforme a través de las diferentes fases del ciclo celular y se divida al mismo tiempo.

Se han descrito diferentes criterios que pueden definir la sincronía de un cultivo celular (Cooper & Shedden, 2003). A continuación se enuncian los más representativos:

- El comportamiento celular debe ser igual tanto en un cultivo sincronizado como en un cultivo no sincronizado.
- El crecimiento celular no se debe ver afectado después de la sincronización.
- Mínimo incremento en la concentración celular durante la interfase (G1, S y G2).
- Contenido de ADN y distribución de tamaño estrechos y tiempos de duplicación comparables.

Métodos de sincronización

Teóricamente, los procedimientos de sincronización celular deben permitir obtener poblaciones de células homogéneas en una determinada fase del ciclo celular. Se pueden dividir en dos grupos (Banfalvi, 2011; Lloyd et al., 2000). El primer grupo se basa en detener la progresión del ciclo mediante la exposición de las células a tratamientos químicos o físicos que arrestan a las células en una determinada fase del ciclo celular. Dichos tratamientos, sin embargo, pueden alterar el metabolismo y la fisiología celular (Cooper, 2002, 2003; Urbani, 1995). Se han realizado estudios para mejorar la producción de proteínas recombinantes en células de mamífero que han sido arrestadas mediante agentes químicos en alguna fase del ciclo celular con la finalidad de incrementar la expresión de proteínas (Sunley & Butler, 2010; Kummar et al., 2007; Li et al., 2006; Ma et al., 2008). Sin embargo, el empleo de agentes químicos de arresto celular alteran de manera importante el metabolismo y la fisiología celular

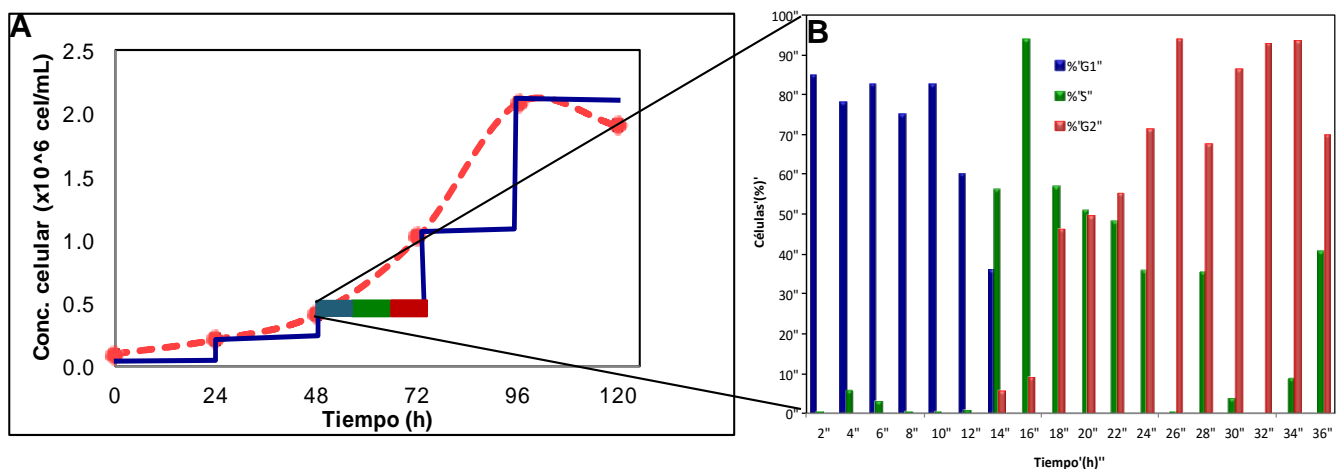


Fig.1. **A.** Perfil de crecimiento celular típico de una población de células heterogéneas, es decir, no sincronizadas (línea roja) vs perfil hipotético de crecimiento celular sincronizado, es decir, perfil de crecimiento escalonado (línea azul). **B.** Distribución del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular durante un ciclo de duplicación en un cultivo sincronizado.

y como consecuencia de ello los resultados obtenidos revelan información que no es específica de la fase del ciclo en donde las células fueron detenidas, si no de los cambios y alteraciones que ha sufrido la célula durante su proceso de arresto.

El segundo grupo se basa en el uso de métodos de separación que aprovechan las propiedades físicas o biológicas de la población celular (tamaño, densidad, área superficial, contenido de ADN, proteínas intracelulares o de membrana, etc.) para purificar o separar poblaciones con las mismas características (Dutton et al., 2006). De entre los múltiples métodos de separación se encuentra la elutriación centrífuga a contracorriente, la cual representa un método ideal para la obtención de altas concentraciones de células sincronizadas en virtud de que se trata de un método preparativo, puede operarse bajo condiciones asépticas y sobretodo porque la alteración al metabolismo y la fisiología celular es mínimo (Grosse et al., 2012; Rosas, 2013). El principio de operación consiste en separar a las células en función de su velocidad de sedimentación (determinado por su volumen y densidad) en un sistema de fuerza centrífuga en un sentido y flujo de fluido en sentido contrario. La suspensión celular heterogénea se hace fluir en contra de un campo gravitacional dentro de una cámara de separación (o de elutriación), donde cada célula se posicionará espacialmente en el punto donde su velocidad de sedimentación esté en equilibrio con la velocidad de flujo de fluido en una posición radial determinada de la cámara. Células de mayor densidad y tamaño

se ubican en el fondo de la cámara (entrada de la cámara) y las más pequeñas en la parte cercana a la frontera de elutriación (salida de la cámara). Una vez que toda la población celular se encuentra dentro de la cámara de elutriación y separado de acuerdo a su velocidad de sedimentación, es posible mediante el incremento progresivo del flujo de fluido de elutriación, ir colectando poblaciones celulares homogéneas en tamaño y densidad creciente (Lindhal, 1956; Grosse et al., 2012). En virtud de que existe una relación directa entre el contenido de ADN (indicativo de la fase del ciclo celular) y el tamaño de la célula, la elutriación centrífuga a contracorriente permite separar poblaciones celulares homogéneas en las diferentes fases del ciclo celular. La utilización del método de elutriación centrífuga a contracorriente como estrategia para obtener poblaciones celulares sincronizadas ha sido de suma importancia para el estudio de múltiples procesos específicos implicados en cada una de las fases del ciclo celular (Simanis & Nurse, 1989).

ESTADO ACTUAL DEL CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES EN BIOREACTORES

El desarrollo de la ingeniería de cultivo celular en biorreactores comenzó a mediados de los años cincuenta en respuesta a la necesidad de técnicas de cultivo en masa que fueran adecuadas para la producción de vacunas. Los primeros biorreactores fueron diseñados específicamente para el cultivo de células adherentes, sin embargo, los primeros productos de interés comercial se generaron mediante cultivo de células en suspensión.

Esto estimuló la adaptación de los sistemas de cultivo en biorreactores que eran utilizados para el cultivo microbiano, para su uso en sistemas biológicos de mayor sensibilidad mecánica. El éxito terapéutico de las proteínas recombinantes generadas por medio de la tecnología del ADN recombinante, como por ejemplo los anticuerpos monoclonales (AcM) en los años ochenta y noventa, impulsó el desarrollo de una gran variedad de biorreactores y de sistemas de cultivo para el cultivo celular en suspensión haciendo especial énfasis en el incremento del rendimiento del producto obtenido a través de un mejor suministro de nutrientes y eliminando productos de desecho. El objetivo de implementar sistemas especializados de cultivo en biorreactor fue minimizar las limitaciones que se presentan en el cultivo celular (por ejemplo un bajo rendimiento en la densidad celular final) proporcionando a las células un ambiente que les permitiese de manera continua generar el producto de interés en altas concentraciones (Fenge & Lullau, 2006). A la fecha, el cultivo de células animales en biorreactores es parte fundamental de la industria farmacéutica para la producción de proteínas terapéuticas debido a la creciente demanda y estrictos requisitos de calidad con las que debe cumplir el producto (Ozturk, 2014). Actualmente, existe una tendencia de realizar los cultivos de células animales en biorreactores desechables. La finalidad de implementar dichos dispositivos es minimizar la contaminación, el tiempo de limpieza y esterilización, además de promover la eficiencia de los procesos y en consecuencia la reducción de tiempo de comercialización de

nuevos productos (ej. proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales para terapia y diagnóstico) (Eibl & Eibl, 2014). En el área de ingeniería de cultivo celular en biorreactores a gran escala no se ha visualizado la necesidad de realizar cultivos tanto homogéneos con respecto a las condiciones medioambientales de cultivo, como de la población celular. Sin embargo, recientemente se han publicado algunos estudios donde se realizan cultivos de células sincronizadas en biorreactores de laboratorio, los cuales reflejan una nueva tendencia de estudiar y conocer, de manera detallada en las diferentes fases del ciclo celular, la contribución de múltiples procesos implicados en la producción de proteínas recombinantes (Barradas et al., 2014; Barrios, 2014; Mendoza, 2014; Mendoza-Pérez et al. 2016).

CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES SINCRONIZADAS EN BIOREACTORES

Existe evidencia de que la manipulación a nivel de ciclo celular de líneas celulares, se ha empleado como estrategia para optimizar la producción de proteínas recombinantes (Kumar et al., 2007). También, múltiples grupos de investigación han aprovechado las ventajas que ofrece la elutriación centrífuga a contracorriente para separar células en determinada fase del ciclo celular y estudiar aspectos celulares básicos sin el objetivo de cultivar las células sincronizadas (Bauer, 1999; Zickert et al., 1993). Feder et al., (1989) mediante elutriación centrífuga obtuvieron poblaciones homogéneas de células CHO con el objetivo de evaluar el patrón de expresión de

la enzima dihidrofolato reductasa (DHRF) y sus niveles de ARNm en las diferentes fases del ciclo celular. La investigación concluyó que la actividad y expresión de la enzima DHRF no cambia a través de las fases del ciclo celular por lo que no puede considerarse una enzima regulada por ciclo. Kauffman et al., (1990) realizaron modificaciones al sistema tradicional de inyección celular y de flúidos del sistema de elutriación centrífuga a contracorriente. Evaluaron la actividad de la enzima cinasa de timidina de poblaciones de células HeLa, human 143tk y fibroblastos murinos Ltk⁻ en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular y determinaron que la elutriación centrífuga a contracorriente es el método físico de separación ideal para enriquecer poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular con mínimas perturbaciones fisiológicas. Wahl & Donaldson, (2001) evaluaron la capacidad de dos rotores con cámara de elutriación estándar para obtener poblaciones celulares sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular de la línea WEHI-231. Determinaron que ambos rotores tienen la capacidad de separar células en las diferentes fases del ciclo celular con alta pureza. Pocos estudios existen respecto de cultivos sincronizados de células animales. Thornton et al., (2002) emplearon un dispositivo de sincronización celular denominado “baby machine” para estudiar el comportamiento de un cultivo sincronizado de células hematopoyéticas de ratón recién nacido L1210. Observaron que dichas células pudieron

mantener un perfil de crecimiento sincronizado durante 35 horas de cultivo, sin embargo, no realizaron más determinaciones analíticas. Lloyd et al., (2000) utilizaron la elutriación centrífuga como método de sincronización celular para estudiar la velocidad de producción de proteínas recombinantes con líneas celulares de importancia comercial, sin embargo, las células sincronizadas fueron cultivadas únicamente por dos horas después de la separación y en un sistema de cultivo estático. Rosas (2013) evaluó y demostró que el proceso de elutriación centrífuga a contracorriente permite obtener células animales sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular con alto grado de pureza y con capacidad para proliferar de manera sincronizada por al menos dos ciclos de duplicación, sin embargo, al igual que en el trabajo de Lloyd et al., (2000), se utilizó un sistema de cultivo estático de bajo volumen y no fue posible realizar determinaciones analíticas en el cultivo sincronizado (ej., consumo y producción de metabolitos, expresión de proteína recombinante, etc.), además de no poder controlar rigurosamente las variables medioambientales del cultivo. Recientemente, Barradas et al., (2014) y Jandt et al., (2014) emplearon como método de sincronización celular la elutriación centrífuga a contracorriente para enriquecer poblaciones de células de mamífero en las diferentes fases del ciclo celular con la posibilidad de cultivarlas en crecimiento sincronizado en biorreactores. Mendoza (2014)

por su parte, desarrolló un sistema y un proceso para realizar cultivos de células animales sincronizadas con respecto al ciclo celular bajo condiciones de cultivo controladas y predeterminadas de oxígeno disuelto, pH, temperatura y agitación, a altas concentraciones celulares y volúmenes de cultivo (**Fig. 2**). Dicho sistema y proceso ofrece importantes ventajas sobre los sistemas tradicionales de cultivo celular. Al acoplar un sistema de separación celular a dos sistemas independientes de cultivo celular en minibiorreactores (tanto para células no sincronizadas como para células sincronizadas)

es posible sincronizar altas concentraciones celulares que permiten realizar cultivos de células homogéneas en su fisiología y metabolismo, a concentraciones celulares y volúmenes de cultivo suficientes para realizar múltiples muestreos y diferentes determinaciones analíticas (Mendoza-Pérez et al., 2016).

Barrios, (2014) evaluó el perfil de consumo de glucosa y glutamina, así como la producción de lactato en cultivos sincronizados de una línea celular de hibridoma murino (BCF2) a una concentración celular inicial de ca. 0.3×10^6 cel mL^{-1} . Los cultivos sincronizados se llevaron a

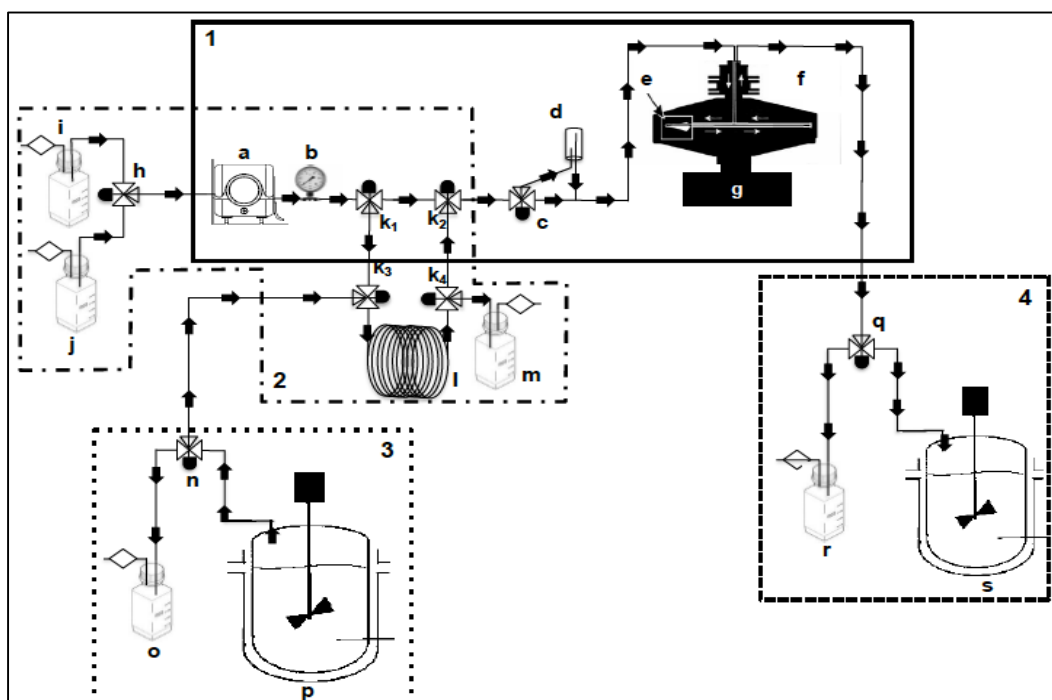


Fig.2. Esquema del sistema de cultivo de células sincronizadas. **1. Sistema de elutriación centrífuga a contracorriente:** a) Bomba peristáltica; b) Indicador de presión; c) Válvula de derivación; d) Trampa de burbujas; e) Cámara de elutriación estándar; f) Rotor JE-6B (Beckman Instruments); g) Ultracentrífuga J2-21. **2. Sistema de inyección de células:** h) Válvula de solución amortiguadora; i) Depósito de solución amortiguadora de elutriación; j) Depósito de medio de cultivo; k_1 - k_4) Arreglo de válvulas de inyección; l) Columna de inyección; m) Depósito de desecho de la columna de inyección **3. Sistema de cultivo en suspensión:** n) Válvula de llenado; o) Depósito del inóculo del minibiorreactor; p) Minibiorreactor instrumentado de 500 mL. **4. Sistema de cultivo en suspensión:** q) Válvula de separación; r) Depósito de desecho; s) Minibiorreactor instrumentado de 250 mL. En todos los casos) Válvula de policarbonato de tres vías.) Filtro de 0.22 μm . Tomado de la solicitud de patente MX/a2015/001503.

cabo empleando el sistema de cultivo de células animales sincronizadas desarrollado por Mendoza, (2014) (Mendoza-Pérez et al., 2016). Las células crecieron de forma sincronizada durante dos ciclos de duplicación y se observó un incremento en el rendimiento lactato/glucosa con respecto a un cultivo no sincronizado. No observaron diferencias en las tasas de consumo/producción de metabolitos entre las diferentes fases del ciclo celular a dichas concentraciones celulares. García (2015) realizó una comparación del comportamiento cinético entre cultivos tradicionales de células CHO-S en crecimiento exponencial no sincronizado y cultivos sincronizados mediante elutriación centrífuga a contracorriente. Los cultivos se realizaron en frascos spinner con un volumen de trabajo de 20 mL y una concentración celular inicial entre 1.5×10^6 cel mL⁻¹. En los cultivos sincronizados, se determinó una mayor velocidad específica de consumo de glucosa, sin embargo, la producción de lactato y el rendimiento lactato/glucosa fueron menores, lo cual indicó un metabolismo de glucosa más acelerado, pero más eficiente.

CONCLUSIONES

Las células, durante su progresión a través de las diferentes fases de ciclo celular, realizan múltiples y muy diferentes procesos metabólicos y fisiológicos, los cuales no pueden ser estudiados mediante los cultivos celulares convencionales. Los cultivos de células sincronizadas en cambio, sí permiten estudiar e identificar procesos específicos de cada fase del ciclo celular que sean

potencialmente relevantes para mejorar la cantidad o calidad de las proteínas recombinantes producidas.

De los métodos de sincronización existentes, la elutriación centrífuga a contracorriente ha demostrado ser el método de sincronización ideal para obtener poblaciones celulares en una determinada fase del ciclo celular con alta pureza y capaces de progresar de manera sincronizada, el cual acoplado a sistemas de cultivo en biorreactores permite cultivar dichas poblaciones bajo condiciones de cultivo controladas y a concentraciones celulares que permiten realizar múltiples muestreos y determinaciones analíticas.

A la fecha, hay muy pocos estudios de cultivos sincronizados de células animales y sólo un par de ellos han utilizado el cultivo en biorreactores para controlar las condiciones de cultivo. No obstante, mediante dicho acercamiento se han identificado diferencias importantes en el comportamiento cinético y metabólico de la población celular, en contraste con lo observado hasta la fecha en cultivos convencionales no sincronizados.

El cultivo de células animales sincronizadas en biorreactores representa un nuevo modo de operación para el estudio detallado, en las diferentes fases del ciclo celular, de los múltiples procesos celulares implicados en la producción de proteínas recombinantes y podría representar en el futuro cercano una estrategia para la optimización de los procesos de producción de proteínas recombinantes, sin embargo, aun hace falta realizar mucha investigación al respecto.

REFERENCIAS

- Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2008) The cell cycle. In: Molecular Biology of the Cell. Anderson M. & Granum S. (eds). Garland Science. USA. pp. 1053-1114. ISBN 0-8153-3218-1
- Abu-Absi NR & Srienc F (2002) Instantaneous evaluation of mammalian cell culture growth rates through analysis of the mitotic index. *J. Biotechnol.* 95(1):63-84.
- Banfalvi G (2011) Overview of cell synchronization. In: Methods in Molecular Biology. Cell Cycle Synchronization: Methods and Protocols. Banfalvi G. (ed). Humana Press. USA. pp. 1-23. ISBN 978-1-61779-182-6
- Barradas OP, Jandt U, Becker M, Bahnemann J, Pörther R & Zeng AP (2014) Synchronized mammalian cell culture: part I--a physical strategy for synchronized cultivation under physiological conditions. *Biotechnol. Prog.* 31(1):165-174.
- Barrios A (2014) Caracterización cinética del crecimiento y metabolismo de células animales en cultivos sincronizados en minibioreactores. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. pp. 1-76
- Bauer J (1999) Advances in cell separation: recent developments in counterflow centrifugal elutriation and continuous flow cell separation. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 722(1-2):55-69.
- Cooper S (2002) Reappraisal of G1-phase arrest and synchronization by lovastatin. *Cell Biol. Int.* 26(8):715-727.
- Cooper S (2003) Rethinking synchronization of mammalian cells for cells cycle analysis. *Cell and Mol. Life. Sci.* 60(6):1099-1106.
- Cooper S & Shedden K (2003) Microarray analysis of gene expression during the cell cycle. *Cell Chromosome* 2(1):1-12.
- Du Z, Treiber D, McCarter J, Yadlin D, Saleem R, McCoy R, Zhang Y, Tharmalingam T, Leith M, Follstad BD, Dell B, Grisim B, Zupke C, Heath C, Morris AE & Reddy P (2014) Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 112(1):141-155.
- Dutton RL, Scharer J & Moo-Young M (2006) Cell cycle phase dependent productivity of a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology* 52(1):55-69.
- Eibl R & Eibl D (2014) Disposable bioreactors for inoculum production and protein expression. In: Animal Cell Biotechnology. Methods and Protocols, Pörtner R. (ed). Humana Press. USA. pp. 322-335. ISBN 1-58829-660-1
- Feder J, Assaraf Y, Seamer L & Schimke R.(1989) The pattern of dihydrofolate reductase expression through the cell cycle in rodent and human cultured cells. *J. Biol. Chem.* 264(34):20583-20590.
- Fenge Ch & Lüllau E (2006) Cell culture biorreactors. In: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, Ozturk S & Hu WS (eds). Taylor and Francis. USA. pp. 155-158. ISBN 0-8247-5334-8
- García J (2015) Estudio del consumo y

- producción de metabolitos de células CHO-S en cultivos sincronizados. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-79.
- Grosse J, Meier K, Bauer T, Eilles Ch & Grimm D (2012) Cell separation by countercurrent centrifugal elutriation: recent developments. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 42(3):217-233.
- Hossler P (2012) Protein glycosylation control in mammalian cell culture: past, precedents and contemporary prospects. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 127:187-219.
- Israels ED & Israels LG (2001) The cell cycle. *Stem Cells* 19(1):88-91.
- Kauffman M, Noga S, Kelly T & Donnenberg A (1990) Isolation of cell cycle fractions by counterflow centrifugal elutriation. *Anal. Biochem.* 191(1):41-46.
- Kromenaker S & Sreenc F (1991) Cell-cycle-dependent protein accumulation by producer and nonproducer murine hybridoma cell lines: a population analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 38(6):665-677.
- Kumar N, Gammell P & Clynes M (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology* 53(1-3):33-46.
- Jandt U, Barradas OP, Pörther R & Zeng AP (2014) Synchronized mammalian cell culture: part II--population ensemble modeling and analysis for development of reproducible processes. *Biotechnol. Prog.* 31(1):175-185.
- Lara AR, Galindo E, Ramírez OT & Palomares LA (2006) Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells. *Mol. Biotechnol.* 34(3):355-81.
- Li J, Sun X & Zhang Y (2006). Improvement of hepatitis B surface antigen expression by dimethyl sulfoxide in the culture of recombinant chinese hamster ovary cells. *Process Biochem.* 41:317-322.
- Lindahl P (1948) Principle of a counter-streaming centrifuge for the separation of particles of different sizes. *Nature* 161(4095): 648.
- Lloyd D & Al-Rubeai M (1999) Cell cycle. In: Encyclopedia of Bioprocess Technology. Spier RE (ed). John Wiley & Sons. New York, USA pp. 465-559.
- Lloyd D, Holmes P, Jackson L, Emery A & Al-Rubeai M (2000) Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. *Cytotechnology* 34(1-2):59-70.
- Ma Z, Yi X & Zhang Y (2006) Enhanced intracellular accumulation of recombinant HBsAg in CHO cells by dimethyl sulfoxide. *Process Biochem.* 43:690-695.
- Mendoza J (2014) Desarrollo de un sistema de cultivo de células animales sincronizadas como una estrategia para el estudio y optimización de los procesos de producción de proteínas recombinantes. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp.1-77.
- Mendoza-Pérez E, Hernández V, Palomares LA & Serrato JA (2016) An integrated system to perform synchronous culture of animal

Artículos

- cells under controlled conditions. *Biotechniques* (en prensa).
- Ozturk S (2006) Cell culture technology-an overview. In: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell Based Therapies, Ozturk S. & Hu W.S. (eds) Taylor and Francis. USA. pp. 1-13. ISBN 0-8247-5334-8
- Ozturk S (2014) Equipment for large- scale mammalian cell culture. In: Mammalian Cell Culture for Biologics Manufacturing, Weichang Z. & Kantardjieff A. (eds). Springer. USA. pp. 69-82. ISBN 978-3-642-54050-9
- Rosas R (2013) La elutriación centrifuga como un método de sincronización de hibridomas murinos BCF2 en las diferentes fases del ciclo celular. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. pp. 1-68.
- Simanis V & Nurse P (1986) The cell cycle control gene *cdc2⁺* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell Press* 45(2):261-268.
- Sunley K & Butler M (2010) Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnol. Adv.* 28(3):385-394.
- Thornton M, Eward KL & Charles EH (2002). Production of minimally disturbed synchronous culture of hematopoietic cells. *Biotechniques* 32(5):1098-1100.
- Urbani L, Sherwood S & Schimke R (1995) Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle. progression by drugs employed in cell synchronization. *Exp. Cell Res.* 219(1):159-168.
- Whal A & Donaldson K (2001) Centrifugal elutriation to obtain synchronous populations of cellsab. In: Current Protocols in Cell Biology. Dasso M. (ed). J. Wiley and Sons, Inc . USA. pp. 8.5.1-8.5.16. ISBN 97804711433031
- Zickert P, Wejde J, Skog S, Zetterberg A & Larsson O (1993) Growth-regulatory properties of G1 cells synchronized by centrifugal elutriation. *Exp. Cell Res.* 207(1):115-124