



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“Análisis de la expresión de interferón gamma humano
usando el sistema de células HEK293-Adenovirus en
ambientes de microgravedad”**

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA

M. F. Carlos Alberto Tavira Montalvan

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Angélica Meneses Acosta

COMITE TUTORAL

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Dr. José Antonio Serrato Pérez

Cuernavaca, Morelos Noviembre 2023.

Cuernavaca, Mor., a 23 de noviembre de 2022

Asunto: asignación de jurado

Folio: FF/D/SI/CIP/DF/138/2022

M. en F. CARLOS ALBERTO TAVIRA MONTALVAN
ALUMNO DEL DOCTORADO EN FARMACIA

PRESENTE

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión Extraordinaria del 22 de noviembre de 2022, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la revisión y evaluación de la tesis titulada **“Análisis de la expresión de interferón gamma humano usando el sistema de células HEK293-Adenovirus en ambientes de microgravedad”**:

Sinodal

Presidente	Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Secretaria	Dra. Judith González Christen
Vocal 1	Dr. Mario Alberto Mendoza-Bárceñas
Vocal 2	Dr. Alejandro García González
Vocal 3	Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza
Suplente 1	Dr. Oscar Peralta Zaragoza
Suplente 2	Dra. Angélica Meneses Acosta

Adscripción

Facultad de Farmacia-UAEM
Facultad de Farmacia-UAEM
CDA-IPN
Inst. Tec. de Monterrey
Facultad de Farmacia-UAEM
INSP
Facultad de Farmacia-UAEM

Se le solicita entregar el presente oficio y manuscrito de tesis a esta comisión, así como dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
“Por una humanidad culta”
Una universidad de excelencia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado en Farmacia

c.c.p Dr. Sergio Alcalá Alcalá, Dra. Judith González Christen, Dr. Mario Alberto Mendoza-Bárceñas, Dr. Alejandro García González, Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza, Dr. Oscar Peralta Zaragoza, y Dra. Angélica Meneses Acosta.
c.c.p. Archivo

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones del laboratorio 7 de Biotecnología Farmacéutica bajo la dirección de la Dra. Angélica Meneses Acosta de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Este trabajo fue apoyado por la beca de posgrado CONACYT No. de CVU: 668180, y financiado por el fondo sectorial AEM-CONACyT 2015 proyecto 262872. Además de usar la infraestructura adquirida con el proyecto 2014 226271 de la convocatoria CONACyT Infraestructura 2014.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Angélica Meneses Acosta, por su guía experta, paciencia y dedicación a lo largo de este arduo proceso. Sus consejos, valores y conocimientos han sido invaluable, y esta tesis no habría sido posible sin su liderazgo.

Agradezco al Dr. Alejandro García. Por su valiosa contribución en la implementación de las redes neuronales diferenciales en el marco de esta tesis. Su experiencia y dedicación han sido fundamentales para el éxito de este proyecto.

Agradezco a mi comité tutorial, Dr. Sergio Alcalá Alcalá y Dr. José Antonio Serrato Pérez. Sus comentarios y sugerencias han enriquecido de manera sustancial el presente trabajo.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al distinguido comité sinodal que tuvo a bien evaluar mi tesis doctoral. Sus contribuciones y evaluaciones han enriquecido significativamente esta investigación y han sido fundamentales para su éxito.

Quiero extender mi gratitud a mis compañeros de laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, quienes han brindado un valioso apoyo y compañerismo durante este viaje académico. Sus aportaciones, discusiones y personalidades han sido inspiradoras.

Agradezco a mis amigos y familiares por su constante ánimo y apoyo emocional. Sus palabras de aliento y comprensión me han dado fuerza para superar los desafíos que conlleva un proyecto de esta magnitud.

No puedo pasar por alto el apoyo financiero proporcionado por CONACyT, cuya beca financió esta tesis. Su respaldo ha sido fundamental para llevar a cabo esta investigación.

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por su apoyo inquebrantable y recursos proporcionados durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

¡Gracias!

DEDICATORIAS

"A Crystal, mi compañera de vida. Esta tesis es el resultado de años de esfuerzo, dedicación, pandemia, enfermedades, muchos gatos, pero las risas y el amor no han faltado. Tú has sido y seguirás siendo mi inspiración y mi fuente de fortaleza."

"A la Dra. Angélica, su compromiso con la excelencia académica, paciencia infinita, apoyo y su capacidad para desafiarme a superar mis límites me han convertido en un investigador más competente y, sobre todo, en una mejor persona."

"A mis queridos padres, quienes han sido mi fuente inagotable de apoyo, amor y motivación a lo largo de toda mi vida. Esta tesis es el resultado de su constante aliento y sacrificio. A mis hermanos, Gracias por siempre estar."

"A mis hijos Rebe y Leo, a mis sobrinos Kamy y Diego, quienes han sido mi fuente de alegría y motivación para superarme cada día. Espero que este logro les inspire a perseguir sus sueños."

"Al Laboratorio de Biotecnología farmacéutica. Dedico este trabajo a mis compañeros/amigos: Mirna, Abdallah, Cony, Chema, a la Dra. Alexa, Michelle, Mario, Hugo, Arturo, Juan, Ximena, Yatziri. Con quienes he compartido largas horas de trabajo, discusiones estimulantes y momentos de camaradería. Juntos hemos logrado mucho"

"A Aurora, Allan, Moisés y Vega, quienes han estado ahí tras bambalinas riendo y compartiendo buenos y malos momentos, pero siempre ahí pendientes de este su humilde Atro de confianza, y claro a nuestros estimados podescuchas".

"A mis gatos Tequi, Gigi, Rony, Thorfinn y Pulque que se nos adelantó. No tenía idea del valor del afecto y compañía de estos animalitos, que siempre están ahí esperando que regreses a casa."

ÍNDICE

1. RESUMEN	11
1.1 ABSTRACT	13
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Microgravedad	15
2.1.2. Plataformas para generar microgravedad real (r- μ g)	16
2.2 Microgravedad simulada.....	20
2.2.1 Plataformas para generar microgravedad simulada (s- μ g)	21
2.2.4 Aplicaciones de la microgravedad simulada en el cultivo de células animales.....	25
2.3 The Rotary Cell Culture System (RCCS). Synthecon, Inc.....	29
2.3.1 Parámetros operativos y límites del funcionamiento de los recipientes de paredes giratorias	33
2.4 Mecanotransducción.....	34
3. ANTECEDENTES	38
3.1 Células HEK293 como sistema de producción de biofármacos	38
3.2 IFN gamma.	41
3.5 Adenovirus.....	44
3.6 Redes neuronales artificiales para el modelamiento de cultivos celulares.....	46
4. JUSTIFICACIÓN	49
5. HIPÓTESIS	49
6. OBJETIVO GENERAL	50
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	51
8.1 Cultivo de células HEK293	52
8.2 El sistema rotatorio de cultivo celular (RCCS)	52
8.3 Evaluación de las condiciones de microgravedad en el montaje experimental.....	52
8.4 Caracterización del cultivo de células HEK293 en condiciones de microgravedad simulada (HARV) y en condiciones de gravedad terrestre (cultivos en matraz agitado).....	54
8.5 Cinética de infección por IFN gamma-adenovirus 5.....	54
8.6 Identificación dinámica no paramétrica mediante redes neuronales diferenciales	55
8.7 Estadística	57
9. RESULTADOS	58

9.1 Establecimiento de los parámetros de operación del dispositivo de microgravedad simulada HARV	58
9.2 Medición del parámetro de microgravedad	63
9.3 Caracterización de cultivos de células HEK293 en condiciones de microgravedad simulada (HARV, 25 rpm; CMS) y en condiciones de gravedad terrestre (cultivos en matraz agitado, 100 rpm: CGT).....	65
9.3 Morfología de cultivos de células HEK293 en condiciones de microgravedad simulada (HARV, 25 rpm; CMS) y en condiciones de gravedad terrestre (cultivos en matraz agitado, 100 rpm: CGT).....	68
9.4 Producción de Ad5/INF- γ y de IFN gamma (INF- γ)	70
9.5 Consumo de nutrientes y producción de subproductos	73
10. DISCUSION.	75
11. CONCLUSIÓN	81
12. PERSPECTIVAS.	82
11. REFERENCIAS	83
12. ANEXOS	94
12.1 Artículo para titulación.	94
12.2 Artículos publicados como coautor durante el Programa de Doctorado.....	105
12.3 Dirección técnica de tesis.....	108
12.4 Participación en congresos	113
12.4.1 Nacionales.....	113
12.4.2. Internacionales.....	115
12. Distinciones	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plataformas que generan microgravedad real (r- μ).....	19
Figura 2. Plataformas para generar microgravedad simulada (s- μ g)	26
Figura 3. Esquema del comportamiento de un clinostato de rotación rápida.	30
Figura 4. Microgravedad modelada de baja cizalladura.)	32
Figura 5. Parámetros de funcionamiento y límites de la función del recipiente de pared giratoria.	35
Figura 6. Alteraciones morfológicas y fisiológicas de las células en crecimiento adherente después de la exposición a microgravedad.	37
Figura 7. Representación gráfica de una RNA.	48
Figura 8 . Simulación de cultivo del dispositivo HARV.	59
Figura 9. Establecimiento de las velocidades de rotación óptimas para el cultivo de células HEK293 en el biorreactor HARV para simular una condición de microgravedad.	61
Figura 10. Determinación del porcentaje de gravedad de células HEK293 bajo CMS.....	62
Figura 11. Crecimiento de cultivos celulares HEK293.	66
Figura 12. Morfología de los cultivos de células HEK293 a las 48 h, 96 h y 144 h.	69
Figura 13. Producción de Ad5/inf- γ en células HEK293.....	71
Figura 14. Producción de IFN gamma recombinante en células HEK293.	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plataformas generadoras de microgravedad real.	17
Tabla 2. Plataformas para generar microgravedad simulada.	21
Tabla 3. Investigación basada en cultivos en microgravedad simulada.....	27
Tabla 4. Productos biológicos aprobados por la FDA producidos en HEK293 desde 2015. Extraído de Tan 2021.	41
Tabla 5. Efecto del INF gamma recombinante en modelos experimentales. El INF gamma, es una molécula inmunomoduladora que puede ser usada para tratar diversas enfermedades.	43
Tabla 6. Componentes X, Y, magnitud y dirección del vector de velocidad.	63
Tabla 7. Componentes X, Y, magnitud y dirección del vector de aceleración.....	64
Tabla 8. Porcentaje de gravedad presentado en cada cuadro para el esferoide.	64
Tabla 9. Tasas específicas de consumo de nutrientes de glucosa y glutamina y tasas específicas de producción de lactato y glutamato bajo CMS y CGT de cultivos de células HEK293.....	74

ABREVIATURAS

s	Segundos
m	Metro
g	Gravedad
µg	Microgravedad
r-µg	Microgravedad real
s- µg	Microgravedad simulada
min	Minutos
ISS	International Space Station
°C	Grados centígrados
ZARM	Centro de Tecnología Espacial Aplicada y Microgravedad
RPM	Máquinas de posicionamiento aleatorio
HARV	Recipiente giratorio de alto aspecto
RWV	Recipiente de pared giratoria
RCCS	Sistema de cultivo celular rotatorio
µm	Micrómetro
T	Tesla
STVL	Vaso lateral de giro lento
Vs	Sedimentación
Vsr	Componentes radiales
Vst	Componentes tangenciales
Vcr	Componentes de fuerza centrífugas
Vct	Movimiento tangencial inducido por Coriolis
Inf-γ	Interferón gamma
HEK293	Human Embriogenic Kidney 293
CHO	Chinese Hamster Ovary
FDA	Food and Drug Administration
AD5	Adenovirus tipo 5
RNA	Redes Neuronales Artificiales
ATCC	American Type Culture Collection
µ	Velocidad específica de crecimiento
Td	Tiempo de duplicación
cél/mL	Células/mililitro
mL	Mililitro
%g	% de gravedad
DNN	Red neuronal diferencial
CMS	Condición de Microgravedad Simulada
CGT	Condición de Gravedad Terrestre
Glu	Glucosa
Gln	Glutamina
Lac	Lactato
E	Glutamato
qs	Velocidad de consumo de sustrato
qp	Velocidad de producción de productos

1. RESUMEN

En las últimas décadas, el desarrollo de biofármacos producidos mediante el cultivo de células animales ha crecido de manera exponencial debido a las posibilidades que estos brindan en el tratamiento de enfermedades crónico/degenerativas e infecciosas. Así, el uso de diferentes sistemas de producción sigue siendo materia de estudio, ya que es necesario tener sistemas cuyas productividades sean competitivas que brinden productos con la calidad y eficacia adecuadas a un costo aceptable.

Por ello, el análisis de novedosas condiciones de cultivo tales como la microgravedad es materia de estudio. El Rotating Cell Culture System (RCCS) en su modalidad de biorreactor High Aspect Ratio Vessel (HARV) proporciona un entorno de microgravedad simulada que ha permitido el establecimiento de modelos *in vitro* de células de mamífero con aplicación en el establecimiento de cultivos organotípicos, modelos de interacción hospedero-patógeno, evaluación de nuevas dianas terapéuticas, toxicología y evaluación de nuevos fármacos. La aplicación de este sistema en el campo de la producción de proteínas recombinantes y vectores virales ha sido casi nula, y para nuestro conocimiento, este trabajo reporta por primera vez la caracterización de cultivos de células HEK293 y la producción de proteína recombinante y vectores adenovirales en medio libre de suero bajo condiciones simuladas de microgravedad en el biorreactor HARV frente a cultivos agitados en gravedad terrestre. Los resultados muestran que los cultivos celulares HEK293 perciben un porcentaje de gravedad mínimo y máximo verticales cuyos valores son $[\%g]$ mínimo= 0,153% (sentido descendente) y $[\%g]$ máximo= -0,053% (donde el signo menos implica sentido contrario a la gravedad) considerando $g=9,81 \text{ m/s}^2$. El crecimiento de las células no se vio afectado, sin embargo, se observaron efectos celulares tales como la formación de agregados en medio con suero y la generación de cultivo de células sin agregados en medio libre de suero. Asimismo, la optimización del consumo de nutrimentos mejoró principalmente en cultivos infectados. Finalmente,

la producción de proteína recombinante y vectores adenovirales se vio favorecida. Dichos fenómenos fueron modelados matemáticamente utilizando un enfoque de ecuación diferencial adaptable utilizando una red neuronal diferencial para poder predecir comportamientos futuros como principio de la optimización del proceso.

Así, se concluye que la microgravedad es un parámetro que ha sido poco estudiado, aunque ofrece ventajas en el cultivo de células HEK293 en la producción de vectores adenovirales y proteína recombinante, siendo a nuestro conocimiento, el primer trabajo en el mundo que reporta este tipo de estudio.

1.1 ABSTRACT

In recent decades, the development of biopharmaceuticals produced through animal cell culture has grown exponentially due to the possibilities they offer in the treatment of chronic/degenerative and infectious diseases. Therefore, the use of different production systems remains a subject of study. So, it is necessary to have systems whose productivities are competitive and provide products with the required quality and efficacy at an acceptable cost.

Hence, the analysis of novel culture conditions such as microgravity is a subject of study. The Rotating Cell Culture System (RCCS) in its High Aspect Ratio Vessel (HARV) bioreactor mode provides a simulated microgravity environment that has allowed the establishment of *in vitro* models of mammalian cells with applications in the establishment of organotypic cultures, host-pathogen interaction models, evaluation of new therapeutic targets, toxicology, and assessment of new drugs. The application of this system in the field of recombinant protein production and viral vector production has been almost non-existent, and to our knowledge, this is the first work that reports the characterization of HEK293 cell cultures and the production of recombinant protein and adenoviral vectors in serum-free conditions under simulated microgravity in the HARV bioreactor compared to stirred cultures in Earth's gravity. The results show that HEK293 cell cultures perceive a minimum and maximum vertical gravity percentage, which values are $[\%g]$ minimum = 0.153% (downward direction) and $[\%g]$ maximum = -0.053% (where the minus sign implies the opposite direction of gravity), considering $g = 9.81 \text{ m/s}^2$. Cell growth was not affected in such a condition, however, cellular effects such as aggregate formation were observed in serum-containing medium, and the generation of aggregate-free cell cultures was observed in serum-free medium. Additionally, nutrient consumption optimization improved mainly in infected cultures. Finally, the production of recombinant protein and adenoviral vectors was favored. These phenomena were mathematically modeled using an adaptable differential

equation approach using a differential neural network to predict future behaviors as a basis for process optimization.

Thus, it is concluded that even though microgravity is a parameter that has been little studied, it offers advantages in the culture of HEK293 cells in the production of adenoviral vectors and recombinant protein. To our knowledge this is the first work in the world that reports this type of study.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Microgravedad

La Tierra genera un campo gravitacional que actúa para atraer objetos con una fuerza inversamente proporcional al cuadrado de la distancia entre el centro del objeto y el centro mismo del planeta. La fuerza de gravedad se mide determinando la aceleración de un objeto sobre el que sólo actúa la gravedad en la superficie de la Tierra en la Tierra, y se refiere como 1g o una gravedad terrestre. Esta aceleración es de aproximadamente $9,8 \text{ m/seg}^2$ (Huang et al., 2018a). Así, la microgravedad, se define como la fuerza que se imparte a un objeto donde la aceleración neta es muy pequeña del orden de 10^{-6} g , en comparación con la producida fuerza de gravedad el superficie de la Tierra (Higginson et al., 2016).

Por compendio se tiene la percepción que en el espacio la fuerza de gravedad es inexistente. Si se deja caer un objeto en la Tierra, este caerá con una aceleración de $9,8 \text{ m/seg}^2$ (1 g). Si el mismo objeto se deja caer por un astronauta en la Estación Espacial Internacional, este también cae; pero parece estar flotando. Esto ocurre debido a que el astronauta, el objeto y la estación espacial están cayendo al mismo tiempo, no hacia la tierra, alrededor de ella. Dado que caen a la misma velocidad dan la percepción de estar flotando en un entorno comúnmente llamado gravedad cero (0 g) o más exactamente en un entorno de microgravedad (10^{-6} g) (DeFelice, 2015; Ferranti et al., 2020).

La necesidad de la humanidad de elucidar cómo se comporta la vida en el espacio, ha significado la apertura de nuevas áreas de investigación a los viajes espaciales, así como nuevas variables experimentales en la Tierra. El estudio de los organismos y células terrestres en el espacio representa una serie de retos a considerar, pero ofrece condiciones poco frecuentes o inexistentes a nivel terrestre (Nickerson et al., 2016a). La primera información relacionada a la microgravedad se publicó en 1951 por Haber H y Gerathewohl SJ, quienes reportaron la física y fisicoquímica de dicho fenómeno

(Haber & Gerathewohl, 1951). Posteriormente, se presentó un avance del estudio de ésta en humanos y animales completos donde se explicaba como influía la microgravedad en sistemas de vuelos parabólicos (Von Beckh, 1954). En la década de los sesentas, se realizaron estudios relacionados con el sistema nervioso central y la condición de orientación de humanos con la idea de conocer el comportamiento del cuerpo humano bajo dicha condición (Reynolds, 1961). Todos estos estudios conducían al entendimiento de los efectos que dicha condición causaba en el cuerpo humano, observando en general efectos negativos tales como: reducción de volumen muscular, desorientación, pérdida de densidad ósea, diuresis, etc. (Lamb, 1964). Es hasta 1965 cuando Pollard, establece de manera teórica el estudio del efecto del fenómeno de microgravedad sobre la célula, considerando que la distribución de las mitocondrias y de los nucleolos pudiera ser afectada por dicha condición debido a una polarización de las membranas (Pollard, 1965). Asimismo, se comienzan a realizar experimentos biológicos satelitales por parte de Rusia principalmente (Sisakyan et al., 1965) y el estudio con sistemas vivientes tales como amebas, plantas, microorganismos, insectos y tejidos de embriones, en donde se observa que en la condición de microgravedad los microorganismos aumentan su patogenicidad y resistencia a los antibióticos (Tixador et al., 1985). Por lo anterior se estableció que los seres humanos, microorganismos y cultivos de células animales presentan cambios inducidos por influencia de la microgravedad.

2.1.2. Plataformas para generar microgravedad real ($r-\mu g$)

Se considera microgravedad real ($r-\mu g$) a aquella condición de ingravidez llevada a cabo en el espacio: la Estación Espacial Internacional (ISS), transbordador espacial o laboratorios orbitales. Existen maneras en la Tierra para generar microgravedad real con marcadas limitantes con respecto al tiempo de exposición a un ambiente de ingravidez, instalaciones como las torres de caída libre, cohetes de sondeo o los aviones con vuelos parabólicos (Hatzistergos et al., 2018; Kiss et al., 2019). En la Tabla 1

se muestran el rango de gravedad alcanzado y el tiempo de exposición que proporcionan tanto los ambientes espaciales como los terrestres (Huang et al., 2018).

Tabla 1. Plataformas generadoras de microgravedad real. Modificado de Huang et al., 2018.

Instalación	Duración	Nivel de gravedad (g)
Torres de caída libre	2-9 s	10^{-5} - 10^{-2}
Vuelos parabólicos	15-30 s	10^{-3} - 10^{-2}
Cohetes de sondeo	6-15 min.	10^{-4} - 10^{-3}
Satélites/ transbordadores	1-2 meses	10^{-5} - 10^{-3}
Estación espacial	permanente	10^{-6} - 10^{-5}

Estación Espacial Internacional (ISS). Los laboratorios de la ISS (Figura 1A) se han convertido en la punta de lanza del estudio de $r\text{-}\mu\text{g}$ hasta la fecha. La ISS proporciona valores de μg en torno a 10^{-5} g, aumentando periódicamente a 10^{-4} g durante la fase de reimpulso una vez al mes. La estación dispone de varias instalaciones que permiten realizar experimentos biológicos. Europa cuenta con el "BIOLAB", en el laboratorio europeo "Columbus", y la instalación autónoma "KUBIK". Estas instalaciones ofrecen entornos ideales para numerosos experimentos biológicos con bacterias, hongos, plantas y células de mamíferos. "KUBIK" es una instalación relativamente sencilla que proporciona 0-2 g y temperaturas entre 6 °C y 38 °C. Una variedad de contenedores con hardware de experimentos disponibles se ajusta a estas instalaciones, con un tiempo de funcionamiento de aproximadamente 18 años de funcionamiento. Asimismo, el "BIOLAB" dispone de una gran variedad de contenedores para experimentos en función de las necesidades científicas. Además de μg , el "BIOLAB" ofrece una centrífuga para generar de 10^{-3} a 2 g en un entorno controlado (de 18 °C a 40 °C, intercambio de gases y regulación de la humedad del 60 al 90%) (Brungs, Egli, Marcel, et al., 2016; Grimm, Schulz, Krüger, Cortés-Sánchez, et al., 2022).

Torres de caída libre. La torre de caída ZARM de Bremen es una instalación europea utilizada para experimentos en condición de $r\text{-}\mu\text{g}$. Esta instalación consta de un contenedor cilíndrico con una altura de 120 m, permitiendo en principio ~ 5 s de microgravedad cuando un objeto se precipita en caída libre al vacío. La instalación

permite un modo catapulta, donde un objeto es lanzado desde la parte inferior, modalidad que debido a la aceleración permite generar un ambiente de $r\text{-}\mu\text{g}$ próximo a los 10 s. El valor de microgravedad alcanzando está dentro del rango de 10^{-5} - 10^{-2} g. Los experimentos realizados en esta instalación comprenden áreas como la astrofísica, biología, química, investigación sobre la combustión, mecánica de fluidos y ciencia de los materiales (Figura 1D)(Gautier et al., 2020).

Vuelos parabólicos. El principio de los vuelos parabólicos se basa en una trayectoria kepleriana (parabólica) mediante el cual se crea un entorno de ingravidez al compensar todas las fuerzas que actúan sobre un objeto en el interior de un avión. Las maniobras del piloto y la velocidad de vuelo estabilizarán una trayectoria kepleriana balística de caída libre para generar una fuerza centrífuga que contrarreste la fuerza de gravedad inherente de la Tierra. Durante el vuelo se generan 31 parábolas, para cada parábola existen dos periodos de hipergravedad con un rango de ~ 1.5 a 1.8 g con una duración de 20 s antes y después de los 30 s de μg con un rango de $\sim 10^{-2}$ g. La NASA utiliza esta plataforma para probar hardware de vuelo que posteriormente se utilizará en misiones espaciales (Figura 1C). Los vuelos parabólicos permiten experimentos de cómo se comportan los fluidos en microgravedad (difusión, ebullición, dinámica y estabilidad), biología celular y desarrollo, aunque con la limitante del tiempo de exposición, fisiología, biología vegetal y la validación de instrumentación para misiones espaciales (Pletser et al., 2015; Pletser & Pletser, 2020).

Cohetes de sondeo. Desde 1950 los cohetes de sondeo se han utilizado para observaciones meteorológicas y estudios de la atmósfera superior, permitiendo que la carga útil pueda ser sometida a un ambiente de microgravedad en rango de 10^{-4} a 10^{-6} g por aproximadamente 15 min. La limitante de esta plataforma es que durante el lanzamiento se experimenta un periodo de hipergravedad de 8 g, lo que debe considerarse cuando los experimentos incluyen muestras biológicas; asimismo se experimenta con otro periodo de aceleración durante la reentrada del cohete a la

atmósfera. Esta plataforma tiene su aplicación en ciencias de los materiales, Biología, Física, y desarrollo de sistemas de lanzamiento (Figura 1E) (Ishizuka et al., 2018).

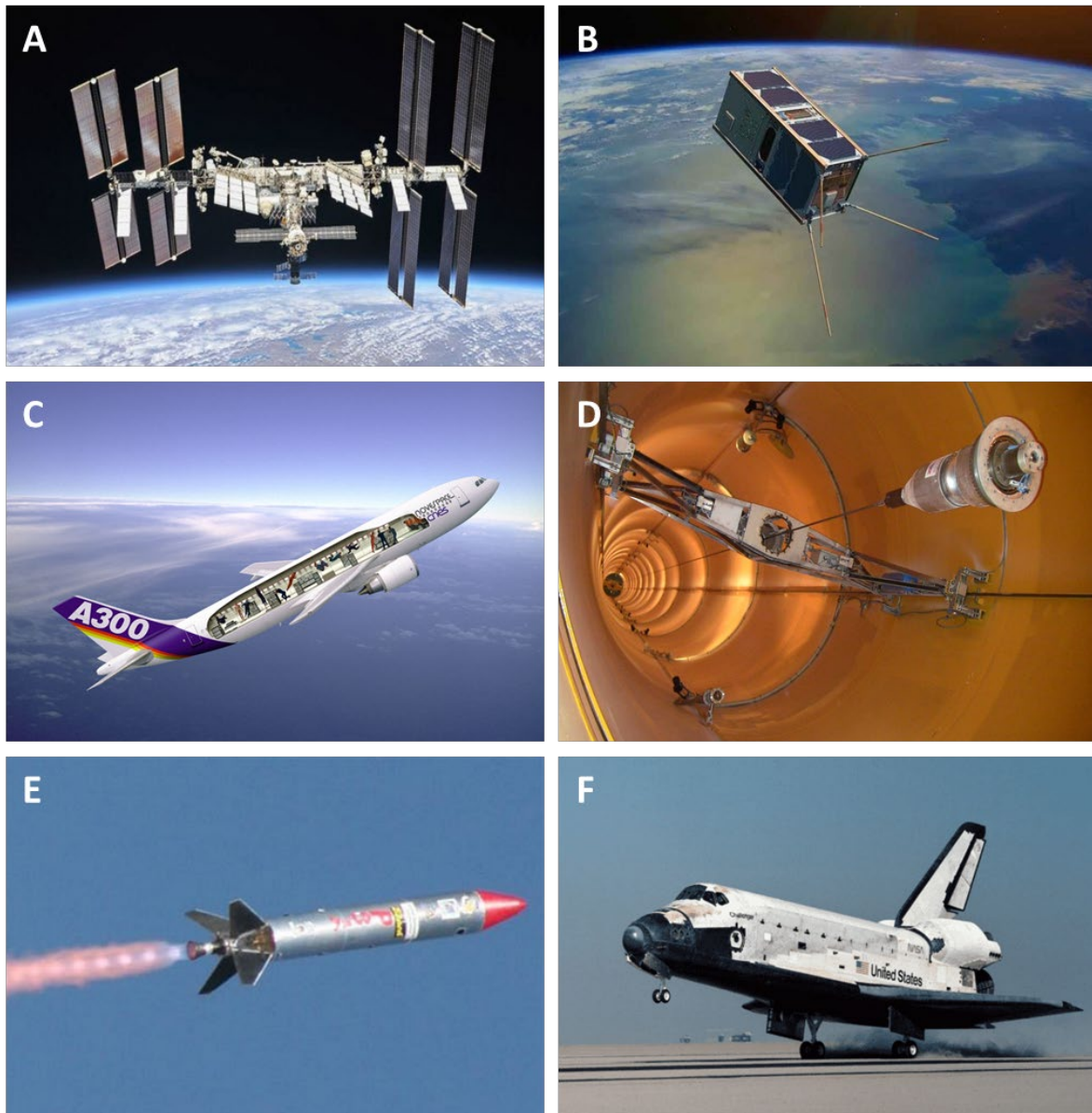


Figura 1. Plataformas que generan microgravedad real ($r-\mu$). A) Estación Internacional Espacial ISS. B) satélites orbitales (categoría CubeSat). C) Vuelos parabólicos. D) Torres de caída Libre (ZARM). E) Cohetes de sondeo. F) Transbordador espacial (NASA). Modificado de Ishizuka et al., 2018; Pletser & Pletser, 2020; Gautier et al., 2020.

2.2 Microgravedad simulada

La infraestructura necesaria para llevar a cabo misiones espaciales tripuladas y no tripuladas con la finalidad de implementar protocolos de investigación con el objetivo de determinar cómo responden los organismos vivos a la microgravedad es costosa y con tiempos de preparación bastantes amplios. Por tanto, el principal reto para utilizar la condición de microgravedad como herramienta de investigación consistió en implementar sistemas que puedan generar microgravedad en la Tierra y que puedan ser puestos en marcha en laboratorios de investigación. La microgravedad simulada también se denomina microgravedad modelada, órbita de caída libre cercana a la Tierra, simulador de micro peso o entorno de baja cizalladura; se aplica a aquel sistema que proporciona un ambiente donde la suma de todas las aceleraciones dependientes de la masa es igual o cercana a cero. Los sistemas que simulan μg en la Tierra, denominados instalaciones en tierra, difícilmente pueden sustituir a los experimentos realizados en órbita en $r-\mu g$, pero sí proporcionan información similar y de gran relevancia para el entendimiento de cómo se comporta la vida en esta condición (Grimm, Schulz, Krüger, Cortés-Sánchez, et al., 2022; Li et al., 2015).

En los años 50's se hicieron los primeros intentos para lograr simular las condiciones de microgravedad en la Tierra. Uno de los sistemas utilizados durante ese periodo era la inmersión de organismos completos (cuerpos humanos entre ellos) en tanques de agua o el estudio del posicionamiento horizontal del cuerpo, con la idea de estudiar dicha condición. A partir del año de 1979, se empezaron a desarrollar trabajos que simulaban las condiciones de microgravedad en ambiente terrestre, en principio se analizaba la interacción de fases sólido-líquido en el espacio. Rodot et al. describieron el comportamiento de esferas en contacto con partículas finitas en condiciones de microgravedad simulada por inmersión en un líquido de igual densidad; sus resultados describían conclusiones relevantes sobre la formación de cristales en el espacio (Rodot et al., 1979).

2.2.1 Plataformas para generar microgravedad simulada ($s-\mu g$)

Se ha sugerido que el término “microgravedad simulada” debiese aplicarse a los protocolos donde la dirección del vector de gravedad ha sufrido un cambio continuo y constante, con el nivel de gravedad promediado cercano a cero junto con la rotación y el tiempo. De hecho, la microgravedad real no puede lograrse con un simulador terrestre porque la magnitud del vector de gravedad de la Tierra no puede modificarse, aunque sí su efecto (Bradbury et al., 2020).

En la Tabla 2 se muestran las distintas plataformas que se utilizan para generar microgravedad simulada, todas a excepción de la levitación magnética utilizan el principio de clinorotación para poder igualar o anular el vector de gravedad, la elección de la plataforma depende de las características el experimento y del sistema biológico (Bradbury et al., 2020; Zhang et al., 2017).

Tabla 2. Plataformas para generar microgravedad simulada. Modificada de Bradbury et al., 2020.

Instalaciones en tierra	Efecto simulado	Organismo	Nivel de gravedad (g)
Clinostatos bidimensionales	Efecto de microgravedad simulada	Tejido vegetal	$\leq 10^{-3}$
Máquinas de posicionamiento aleatorio (RPM) (clinostatos 3D)	Efecto de microgravedad simulada	Tejido vegetal	$\leq 10^{-4}$
Recipientes giratorios de alto aspecto (HARV)	Microgravedad modelada de baja cizalladura	Células humanas, células animales, bacterias y virus.	$\leq 10^{-3}$
Sistema de cultivo celular rotatorio (RCCS)	Microgravedad modelada de baja cizalladura	Células humanas, células animales, bacterias y virus.	$\leq 10^{-3}$
Aparato de levitación diamagnética	Efecto de microgravedad simulada	Protozoos y plantas.	$\leq 10^{-2}$

Clinostato Rotatorio. En un clinostato, el cultivo gira con el objetivo de que se disminuya el vector de aceleración de la fuerza de gravedad. Un Clinostato puede tener distintas configuraciones en relación con el número de ejes de rotación, la dirección y la velocidad de estos. En el clinostato con un eje de rotación la dirección del vector de gravedad es perpendicular (clinostatos 1-D o clinostatos 2-D) (Navran, 2008). Las

muestras se posicionan cerca del eje de rotación para mantener las aceleraciones centrífugas lo más reducidas posible, esto tiene como consecuencia que el diámetro de los recipientes sea del rango de mm. Las partículas giran en trayectorias circulares, el radio de las trayectorias depende de la velocidad de rotación y de la diferencia de densidad entre las partículas y el líquido circundante. La velocidad debe optimizarse; velocidades bajas provocan sedimentación, velocidades rápidas provocan centrifugación. Al trasladar el principio a nivel celular, la célula percibe la tensión y presión a través de la interacción con los elementos citoesqueléticos y los canales iónicos mecanosensibles. En esta plataforma, los sistemas expuestos perciben la microgravedad en un rango de 0,008 g a 0,018 g con un diámetro de máx. 4 mm durante una velocidad de rotación de 60 rpm (Trotter et al., 2015; H. Wang et al., 2016). Los clinostatos se complementan con tecnologías desarrolladas específicamente para el sistema como el desarrollo de microscopios de observación (microscopio clinostato) o cinética en línea (fotomultiplicador clinostat) (Brungs, Egli, Wuest, et al., 2016) (Figura 2A).

Primeros estudios con clinostatos se centraron en la influencia de la microgravedad simulada en cultivos de plantas, no obstante, los resultados no reflejaban un efecto antigravitatorio importante (Hoson et al., 1997; Navran, 2008). En 1992, Briegleb introdujo el concepto de clinorotación rápida para poder lograr una ingravidez funcional en células individuales (Briegleb, 1992).

Máquina de posicionamiento aleatorio 3D. Tiene las características de un clinostato 2D, pero con una mayor aleatorización direccional. Los cultivos celulares en este sistema tienden a rotar aleatoriamente alrededor de 2 ejes. Este movimiento provoca una reorientación continua del vector de gravedad ejercido sobre el cultivo simulando microgravedad, ya que el vector de gravedad se distribuye en todas direcciones. Lo anterior se hace posible debido a que las RPM emplean 2 bastidores que giran independientemente uno de otro (Buker et al., 2019). La implementación de técnicas ópticas y de monitoreo en tiempo real son necesarias para el análisis del

comportamiento de un cultivo celular en condiciones de microgravedad simulada. Sin embargo, las RPM tienen la desventaja que dada la configuración del equipo es complicado implementar sistemas de monitoreo del cultivo mientras está operando, por lo que debe considerarse que el sistema no es aplicable para todas las condiciones experimentales (Figura 2B) (Kopp et al., 2016). Existen evidencias de que el uso de las RPM puede generar efectos más cercanos a los efectos de la microgravedad real en el espacio cuando giran lo suficientemente rápido como para que el organismo no pueda percibir y experimentar el vector gravedad. Se ha observado que las plantas y otros organismos superiores, son candidatos más adecuados e ideales para las investigaciones con RPM, lo que representa una ventaja importante sobre los clinostatos 2D. Las RPM puede considerarse como un dispositivo mecánico adicional para reducir los efectos a largo plazo de la fuerza mecánica de la gravedad. Debido a la constante reorientación de las muestras en el RPM, ya no se desencadenarán respuestas intracelulares dependientes de la gravedad (Brungs, Egli, Wuest, et al., 2016; Ferranti et al., 2020; Huang et al., 2018) (Figura 2B).

Levitación magnética. A diferencia de los diversos tipos de clinostatos que intentan aleatorizar el efecto de la gravedad anulando el vector de gravedad por efecto de la rotación, las fuerzas magnéticas contrarrestan la fuerza de la gravedad mediante un gradiente magnético y de la susceptibilidad diamagnética del objeto. Este gradiente existe en dos direcciones opuestas de tal manera que en un campo magnético orientado verticalmente y el gradiente superior equilibra los efectos de la gravedad sobre el material biológico. El polo opuesto del gradiente magnético también genera una fuerza equivalente de 1g y, por tanto, proporciona un equivalente de 2g (1g atribuido al gradiente magnético además de la gravedad original). Aunque el efecto de los gradientes magnéticos y las propiedades diamagnéticas del objeto levitado equilibra el efecto de la gravedad; es decir, suspende de forma estable los objetos biológicos en el espacio, es probable que el campo magnético fuerte ~15 T y el gradiente afecten al movimiento de los iones, alterando las condiciones fisiológicas

que afectan a la expresión génica (Herranz et al., 2012; Parfenov et al., 2020). Se debe tomar en cuenta la complejidad del sistema ya que, el reducido espacio en el orificio de un imán, la necesidad de refrigerar los imanes manteniendo la temperatura ambiente para las muestras biológicas. El fuerte campo magnético (1.400 T2/m) y el gradiente necesario también requieren sistemas magnéticos especializados cuyo funcionamiento requiere de costos altos. Se necesita más investigación para determinar qué sistemas imitan mejor las condiciones de gravedad reducida, especialmente para las plantas que ocupan un gran volumen y, por tanto, se ven afectadas por cualquier gradiente de condiciones rotacionales, inerciales o magnéticas. Aún con las limitaciones de la plataforma, la capacidad de producir fuerzas de gravedad parciales o incluso excesivas hace que los gradientes magnéticos sean una alternativa en comparación con las plataformas basadas en los clinostatos (Sanavandi & Guo, 2021b). El atributo más sobresaliente de los campos magnéticos de alto gradiente es la capacidad de levitar con precisión orgánulos celulares, como los estatolitos en raíces, hipocótilos, rizoides y plántulas. También, se ha demostrado que la levitación magnética es un sustituto terrestre útil de la microgravedad en otros sistemas biológicos, como las células de osteoblastos, *Drosophila melanogaster* y bacterias (Kiss et al., 2019; Sanavandi & Guo, 2021) (Figura 2C).

Recipientes de Pared Rotatoria (RWV). El Recipiente de Pared Rotatoria fue desarrollado por la NASA y se distribuye comercialmente como Sistema de Cultivo Celular Rotatorio (RCCS) a través de Synthecon, Inc. (Houston, Texas)(Grimm et al., 2014). El diseño del biorreactor RWV para generar microgravedad simulada se basa en el principio de que los órganos y tejidos funcionan en un ambiente tridimensional 3D. Este diseño optimizado para cultivos en suspensión se utiliza principalmente para el cultivo de células en 3D que mantienen muchas características especializadas de los tejidos *in vivo*. El RWV proporciona un ambiente de bajo cizallamiento con magnitudes menores a 0,01 dinas/cm². El microambiente proporcionado por el RWV permite que las células formen agregados tridimensionales cuyo tamaño depende de la densidad celular y de

si se está utilizando algún tipo de andamiaje alcanzando tamaños del rango de 20 μm a 1 μm (Barrila et al., 2010). El sistema consiste en un cilindro de hasta 20 cm de diámetro, que gira continuamente perpendicular al vector de gravedad terrestre. El RVW se utiliza para examinar las interacciones célula-célula y las cascadas de señales subyacentes para dilucidar los fundamentos de la formación de tejidos. Estudios comparativos, por ejemplo, realizados por Hammond et al. en 2018 revelaron diferencias en las respuestas de la levadura en el RWV frente al RPM con respecto a los cambios de expresión génica mediados por los promotores del estrés de cizalla, el estado redox y la apoptosis. Los autores concluyeron que las fuerzas inducidas por el posicionamiento aleatorio y la rotación constante de la RWV son diferentes y distintas. Este ejemplo también indica que es probable que las tensiones de cizallamiento inducidas en la superficie de la membrana sean variables importantes que afectan a la forma en que las células perciben la gravedad (T. Hammond et al., 2018)(Figura 2D).

2.2.4 Aplicaciones de la microgravedad simulada en el cultivo de células animales

Durante los últimos 40 años, los programas de Biología Espacial y Ciencias de la Vida de la NASA han aportado conocimiento importante sobre el comportamiento de los sistemas celulares a bordo de los vuelos espaciales. Se han observado adaptaciones en los cambios de expresión génica, cambios en la morfología celular, locomoción, señalización transmembranal, metabolismo y asociación celular (Navran, 2008). Los diferentes enfoques que ofrece el establecimiento de protocolos de investigación basados en cultivos en microgravedad simulada se muestran en la Tabla 3. Dadas las diferencias con base en la complejidad y funcionalidad, la elección del dispositivo y del tipo de cultivo, depende directamente de la aplicación. El estudio del cáncer es una de las áreas con más proyección en los protocolos que involucran sistemas de microgravedad simulada.

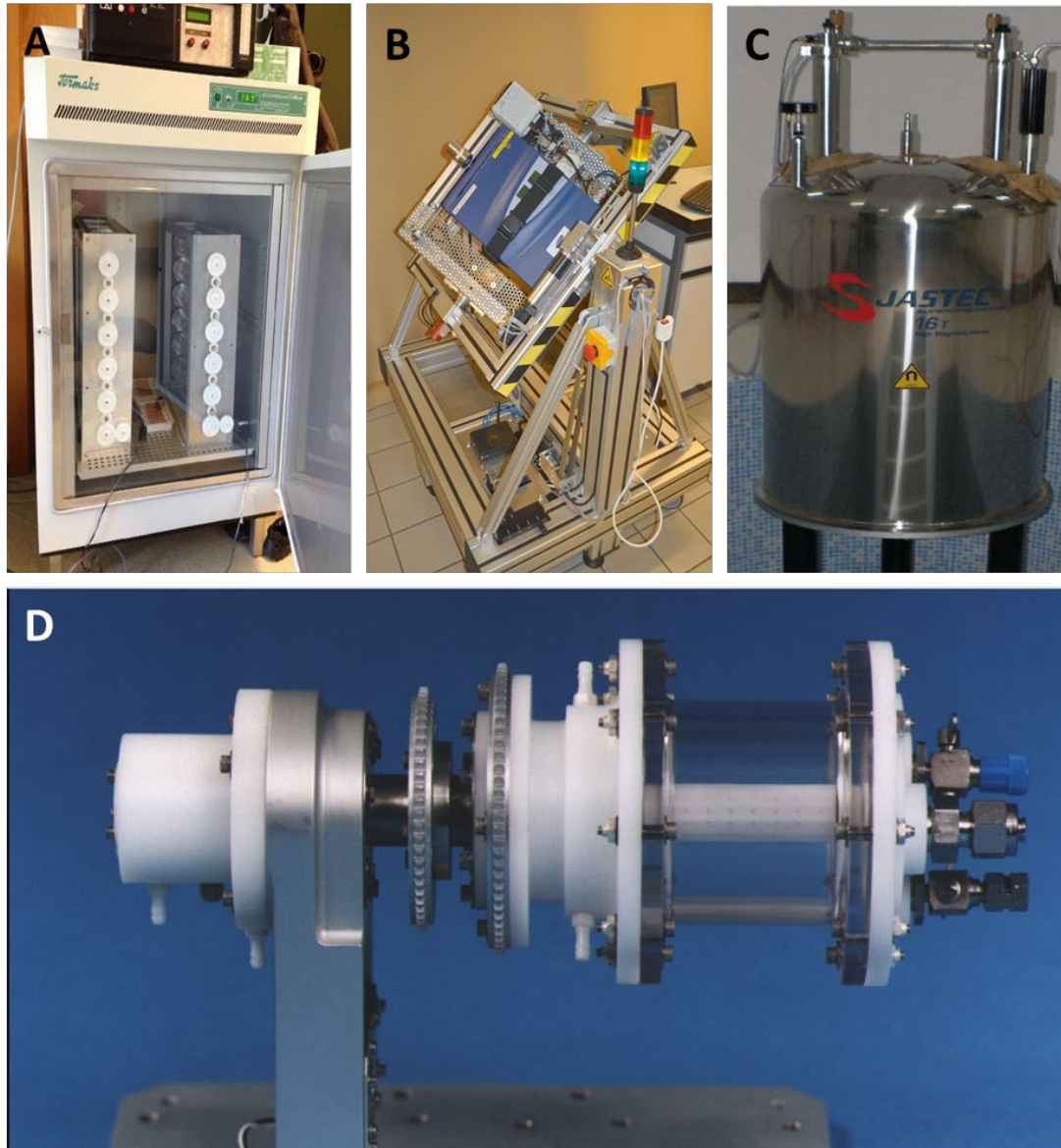


Figura 2. Plataformas para generar microgravedad simulada (s- μ g). A) Clinostato 2-D. construida por el Instituto de Medicina del centro Aeroespacial Alemán (DLR), Instituto de Medicina Aeroespacial. B) Máquina de posicionamiento aleatorio (RPM) con una incubadora de CO₂ integrado, desarrollada por el Instituto de Automatización, Universidad de Ciencias Aplicadas del Noroeste de Suiza. C) Levitación magnética. Sistema de imanes superconductores refrigerados para cristalización de proteínas en s- μ g. D) Recipientes de Pared Rotatoria (RWV). Biorreactor de microgravedad RWV desarrollado por la NASA. Modificada de Kiss et al., 2019; Sanavandi & Guo, 2021; T. Hammond et al., 2018; Ferranti et al., 2020.

Dado que los ambientes de $s-\mu g$ proporcionan un entorno excepcional para el cultivo celular y se ha demostrado que estimula cambios y procesos celulares que no podrían lograrse en condiciones de gravedad terrestre. La información se ha obtenido a partir de protocolos con células de cáncer de tiroides, mama y próstata, bajo $r-\mu g$ en el espacio o durante $s-\mu g$ en sistemas terrestres. Los cultivos de células de cáncer son capaces de diferenciarse en dos fenotipos distintos en condiciones μg : una población se mantiene como células adherentes situadas en el fondo del matraz de cultivo, y otra población se agrega en esferoides multicelulares tridimensionales (Grimm et al., 2022).

Tabla 3. Investigación basada en cultivos en microgravedad simulada.

Célula/Tejido	Dispositivo	Observaciones	Referencia
Células de ratón (CGR8)	Clinostato 2-D	Estudio de la formación del cuerpo embrionario en células progenitoras pluripotentes bajo clinorotación.	(Shinde et al., 2016)
Microcrustáceos (<i>D. magna</i> ; <i>D. cucullata</i> , <i>H. ncongruens</i>)	Clinostato 2-D sumergido	La clinorotación no induce aceleración en forma de turbulencia a pequeña escala, que puede ser percibido por <i>Daphnia</i> . Desarrollo embrionario normal.	(Fischer et al., 2016)
<i>A. thaliana</i> (raíces)	Clinostato 2-D	Compensación de la sedimentación de estatolitos y la subsiguiente redistribución de auxinas.	(H. Wang et al., 2016)
Células de carcinoma de tiroides humano (FTC-133)	RPM	Formación de esferoides, aumento de la liberación de citocinas en el RPM y una disminución en el Clinostato.	(Warnke et al., 2016)
Condrocitos humanos	RPM	Cultivo sin andamiaje de condrocitos humanos durante 7 día en RPM resultó en formación de esferoides, acompañada de cambios en el citoesqueleto.	(Wehland, 2016)
Aorta porcina (PAEC)	RPM	Estudio de la muerte celular, genes proapoptóticos (p53, FAS-L, BAX), genes antiapoptóticos (Bcl-2). Deterioro de la capacidad de respuesta celular a los estímulos exógenos.	(Morbidelli et al., 2005)
Leucemia mieloblástica aguda humana (ML-1)	RPM	202 cadenas de polipéptidos diferentes identificadas en comparación con los controles a 1g (enzimas glicolíticas y proteínas estructurales).	(Pietsch et al., 2011)

Línea celular de cáncer folicular de tiroides humano (FTC-133)	RPM	Modelo de vías de señalización relacionado con diferentes procesos biológicos, como la formación de esferoides <i>in vitro</i> y metástasis <i>in vivo</i> .	(Melnik et al., 2019)
Células progenitoras mesenquimales derivadas de la médula ósea humana (hMSC)	RCCS	Imitación de la topología del tejido óseo y señales osteogénicas. Ensayos y análisis de susceptibilidad a fármacos sin la necesidad de implantación en animales.	(McNeill et al., 2018)
Células de insecto (Sf-21)	RCCS	Evaluación de la expresión de glicoproteínas en ambientes de microgravedad simulada.	(Joosten & Shuler, 2003)
Células epiteliales amnióticas humanas (CEA)	RCCS	Los injertos trasplantados con CEA demostraron ser más lentos al rechazo en comparación con islotes no modificados.	(Zafar et al., 2019)
Células progenitoras neurales humanas (hNPC)	RCCS	Expansión a gran escala y diferenciación neuronal de los hNPCs.	(Srinivasan et al., 2018)
Células de cáncer de próstata humano (DU-145)	RCCS	Establecimiento de modelo de transducción de señales, describe la dinámica del crecimiento 3D en HARV bajo condición de microgravedad.	(Clejan et al., 2001)
Aislado de células corticales renales humanas	RCCS	Evidencia de que la mecánica del cultivo en RCCS modula la expresión de proteínas en cultivos en suspensión.	(Cowger et al., 2017)
Células progenitoras de ratón pluripotentes inducidas (iPSC)	RCCS	Generación de cardiomiocitos a partir de (PSC), aplicaciones, ensayos y modelos para el desarrollo de fármacos.	(Rungarunlert et al., 2016)
Aislados de cardiomiocitos de rata neonatal (NRCM)	RCCS	Efectos de la microgravedad en los procesos moleculares dentro del entorno celular.	(Feger et al., 2016)
Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	RCCS	Estudio el efecto de la falta de gravedad en la proliferación de leucocitos, las respuestas de citocinas y la producción de anticuerpos.	(Moreno-Villanueva et al., 2018)
Aislados de fibroblastos de prepucio humano neonatal	RCCS	Aplicación de HDF-mAM criopreservado como un sustituto dérmico vivo para el tratamiento de úlceras diabéticas y otras heridas crónicas en clínicas.	(Zheng et al., 2015)
Tejido ovárico de ratón	RCCS	Modelo para la investigación de los mecanismos involucrados en el	(S. Zhang et al., 2017)

desarrollo *in vitro* de ovocitos/
folículos.

Glándula submandibular de rata	RCCS	Modelo potencial para la regeneración de las glándulas salivales mediante ingeniería tisular.	(Gao et al., 2015)
Células de cáncer de seno humano (MDA-MB-231)	RCCS	Desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para tratar la metástasis tumoral y cancerosa.	(Caccuri et al., 2017)
Macrófagos de ratón RAW 264	Levitación magnética	Modelo del complejo Arp2 / 3, síntesis del citoesqueleto y función inmune,	(S. Wang et al., 2021)
línea murina JAWS II DC	Levitación magnética	Análisis maduración y la producción de interleucina-6.	(Tackett et al., 2019)

2.3 The Rotary Cell Culture System (RCCS). Synthecon, Inc

Como ya se ha mencionado, una de las estrategias para generar condiciones de microgravedad simulada es la clinorotación. Dicha técnica produce una rotación rápida que origina la neutralización de la sedimentación. En el sistema una célula es forzada a seguir una trayectoria circular cuyo radio está definido por la velocidad de rotación. La rotación rápida da lugar a menos movimientos relativos en comparación con la rotación lenta y a una velocidad excesivamente alta en las aceleraciones centrífugas. En la Figura 3 se muestra cómo es que se comportarían las partículas dependiendo la condición: en la presencia del vector de gravedad éstas se sedimentan; en $r-\mu g$ las partículas se encuentran en caída libre constante en órbita con la Tierra; mientras que en un sistema de $s-\mu g$ las células anulan el vector de gravedad siguiendo una trayectoria circular entrando en niveles de gravedad próximos a $10^{-3} g$ (Brungs, Egli, Wuest, et al., 2016)(Microgravity et al., 2018)(Vashi et al., 2023). Este principio es el que rige los Recipientes de Pared Rotatoria (RCCS).

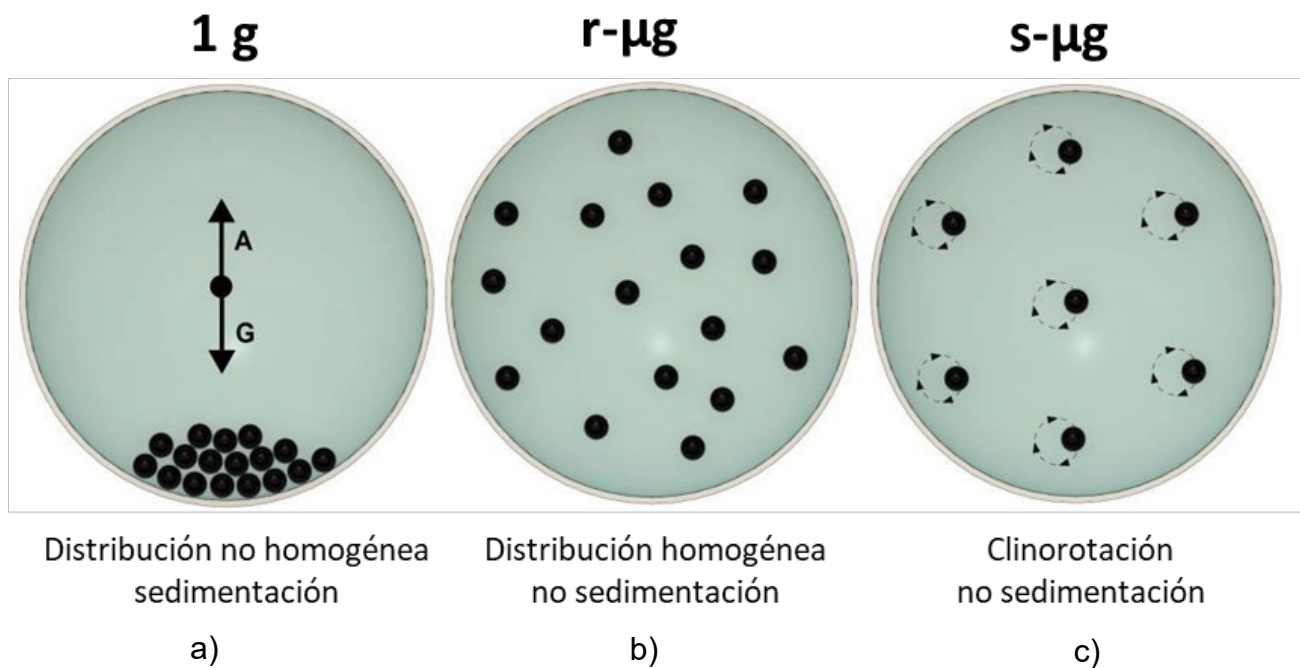


Figura 3. Esquema del comportamiento de un clinostato de rotación rápida. a) En la Tierra, las partículas se sedimentan. Las fuerzas de gravedad y flotabilidad determinan la posición de las partículas. b) En condiciones de microgravedad real ($r\text{-}\mu\text{g}$), las partículas se distribuirán homogéneamente debido a una condición de $10^{-6} g$. c) En microgravedad simulada ($s\text{-}\mu\text{g}$) la rotación rápida perpendicular al vector de gravedad genera un movimiento circular de las partículas. Imagen modificada de Vashi et al., 2023.

El Recipiente de Pared Rotatoria fue desarrollado por la NASA y se distribuye comercialmente como Sistema de Cultivo Celular Rotatorio (RCCS) a través de Synthecon, Inc. (Houston, Texas) (Grimm et al., 2014). Este diseño optimizado para cultivos en suspensión se utiliza principalmente para el cultivo de células en 3D que mantiene muchas características especializadas de los tejidos *in vivo*. El RWV proporciona un ambiente de bajo cizallamiento con magnitudes menores a $0,01$ dinas/cm². El microambiente proporcionado por el RWV permite que las células formen agregados tridimensionales cuyo tamaño depende de la densidad celular y de si se está utilizando algún tipo de andamiaje alcanzando tamaños del rango de $20 \mu\text{m}$ a 1 mm (Barrila et al., 2010).

El RCCS se compone de un recipiente cilíndrico con rotación horizontal y un sistema de oxigenación coaxial, el recipiente se llena en su totalidad de medio de cultivo. Al rotar el flujo de fluido se acopla a la pared del recipiente girando como un cuerpo sólido. El núcleo oxigenador es fijo y gira a la misma velocidad angular que la pared exterior, creando así un flujo laminar con una fuerza de corte mínima. Los cultivos en este sistema se mantienen en suspensión por la resolución de las fuerzas gravitacionales, centrífugas y de Coriolis (Manley & Lelkes, 2006). El principal determinante de la velocidad de sedimentación es el tamaño del agregado celular que, de acuerdo con la ecuación de Stokes, aumenta en proporción al cuadrado del radio. El vector de sedimentación aumenta rápidamente y es necesario aumentar la velocidad de rotación del RCCS para mantener los agregados en suspensión y evitar colisiones con las paredes del recipiente. Por tanto, deben establecerse los parámetros de operación para cada protocolo de cultivo (T. G. Hammond & Hammond, 2017; Nickerson et al., 2003). Existen dos diseños de RCCS diferentes: el vaso giratorio de alto aspecto (HARV) (Figura 4C); y, el vaso lateral de giro lento (STLV) (Figura 4B), que difieren en su sistema de oxigenación. Sin embargo, ambas configuraciones comparten el mismo principio de funcionamiento (Barrila et al., 2010; SYNTHCON, 2019). El recipiente de pared giratoria proporciona principios de funcionamiento fluidodinámicos caracterizados por: rotación de cuerpo sólido alrededor de un eje horizontal que se caracteriza por la colocación de células y agregados de diferentes velocidades de sedimentación, cizallamiento y turbulencia del fluido óptimamente reducidos y libre dominio espacial tridimensional y oxigenación por difusión (T. G. Hammond & Hammond, 2017; Vidyasekar et al., 2017).

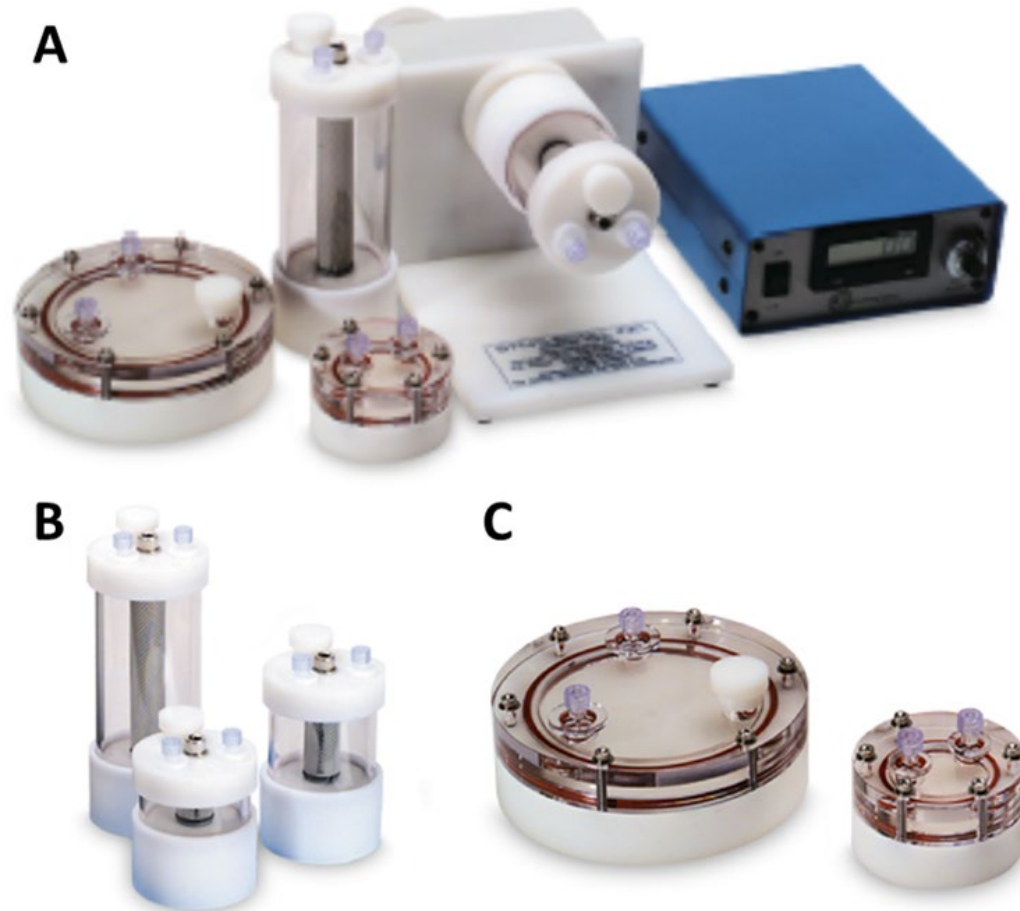


Figura 4. Microgravedad modelada de baja cizalladura. A) Sistema de cultivo celular rotativo (RCCS). B) Recipientes de alta relación de aspecto (HARV). C) Recipientes laterales de giro lento (STLV). Imagen modificada de SYNTHCON, 2019.

El bajo corte de fluido también promueve la co-localización de partículas en el fluido y conduce a la formación de agregados celulares. Además, este entorno de bajo flujo de fluido imita el flujo *in vivo* durante el desarrollo y, por lo tanto, promueve la diferenciación celular y crecimiento del cultivo en 3D. El desarrollo de agregados 3D se mantiene en un estado de caída libre continuo, manteniendo al mismo tiempo el ambiente de baja fluidez-cizallamiento, permitiendo a las células establecer estructuras complejas observadas *in vivo*. En el biorreactor RWV, la oxigenación se produce por la difusión de gases disueltos, proporcionando la oxigenación necesaria para formar agregados manteniendo el bajo flujo de fluido. Estas condiciones de crecimiento permiten desarrollar ultraestructuras organotípicas que no están

fácilmente presentes en el cultivo de células en monocapa convencional y son necesarias para avanzar en el desarrollo de células *in vitro* que efectivamente imitan el tejido *in vivo*. Por ejemplo, las células epiteliales crecidas en el biorreactor expresan proteínas de adhesión, forman uniones estrechas (Gardner & Herbst-Kralovetz, 2016).

Las células que se cultivan en el biorreactor reflejan un fenotipo específico. Por ejemplo, las células epiteliales vaginales forman un estratificado de múltiples capas, epitelio escamoso, mientras que las células epiteliales endocervicales forman una sola capa como se encuentra *in vivo*. Por lo tanto, refleja las características micro anatómicas auténticas del tejido de origen. En el caso de modelos de cáncer, por ejemplo, las células MCF-7 ya no requieren la matriz extracelular para el crecimiento, se adhieren y crecen en las perlas recubiertas de colágeno, reflejando así su fenotipo tumoral. Los agregados completamente diferenciados pueden permanecer en el biorreactor, ser recolectados para experimentos posteriores, incluyendo infecciones (Marrero et al., 2009).

2.3.1 Parámetros operativos y límites del funcionamiento de los recipientes de paredes giratorias

T. G. Hammond y J. M. Hammond en el 2001 determinaron los principios de ingeniería que permiten establecer cultivos en un ambiente de microgravedad simulada de bajo cizallamiento. Los parámetros de funcionamiento y límites de la función de recipiente de pared giratoria se describen en la Figura 5. El diagrama A define la velocidad vectorial. Se muestran las fuerzas que actúan sobre una partícula bajo la influencia de un fluido viscoso en rotación. La sedimentación inducida por la gravedad (V_s) puede resolverse en componentes radiales (V_{sr}) y tangenciales (V_{st}) dirigidos hacia el interior. También existe una velocidad de partícula dirigida hacia el exterior debido a la fuerza centrífuga (V_{cr}). El movimiento tangencial inducido por Coriolis (V_{ct}) produce una espiral de partículas en la corriente de fluido (Figura 5A). El diagrama B representa la magnitud de la desviación de las partículas a través de las líneas de corriente en el

recipiente de pared giratoria. Obsérvese que la relación entre la distorsión inducida por la gravedad y las rotaciones por minuto es una función exponencial inversa, mientras que la desviación debida a la fuerza centrífuga está directamente relacionada de forma lineal con las rotaciones por minuto (Figura 5B). El radio de la espiral inducida por la fuerza de Coriolis a baja velocidad puede reducirse inicialmente aumentando la velocidad de rotación, pero degenera rápidamente hasta que los agregados celulares se adhieren a la pared exterior a medida que aumenta la velocidad de rotación. En la Figura 5C se observa la trayectoria calculada de una partícula en el recipiente de pared giratoria en función del tiempo en un marco de referencia estacionario, observando que la partícula se aproxima al estado estacionario asintótico, a medida que se aproxima al punto de equilibrio de las fuerzas centrífugas y de Coriolis. La Trayectoria calculada del agregado de la célula del vaso de pared giratoria dibujada en el marco de referencia giratorio se muestra en la Figura 5D (T. G. Hammond & Hammond, 2001; Nickerson et al., 2016b).

2.4 Mecanotransducción

La mecanobiología estudia como las células, los tejidos y los órganos pueden detectar y responder a señales mecánicas para regular numerosos procesos biológicos, incluidos el desarrollo, la diferenciación, la fisiología y las enfermedades. A nivel celular, las señales mecánicas de la matriz extracelular circundante (ECM) controlan la fisiología celular normal. Los procesos de mecanodetección y mecanotransducción involucran componentes intra y extracelulares como las integrinas, las proteínas ECM y el citoesqueleto (CSK). Las integrinas desempeñan un papel fundamental en la mecanodetección celular al conectar físicamente el CSK al ECM que forma grupos denominados "adherencias focales (FA)".

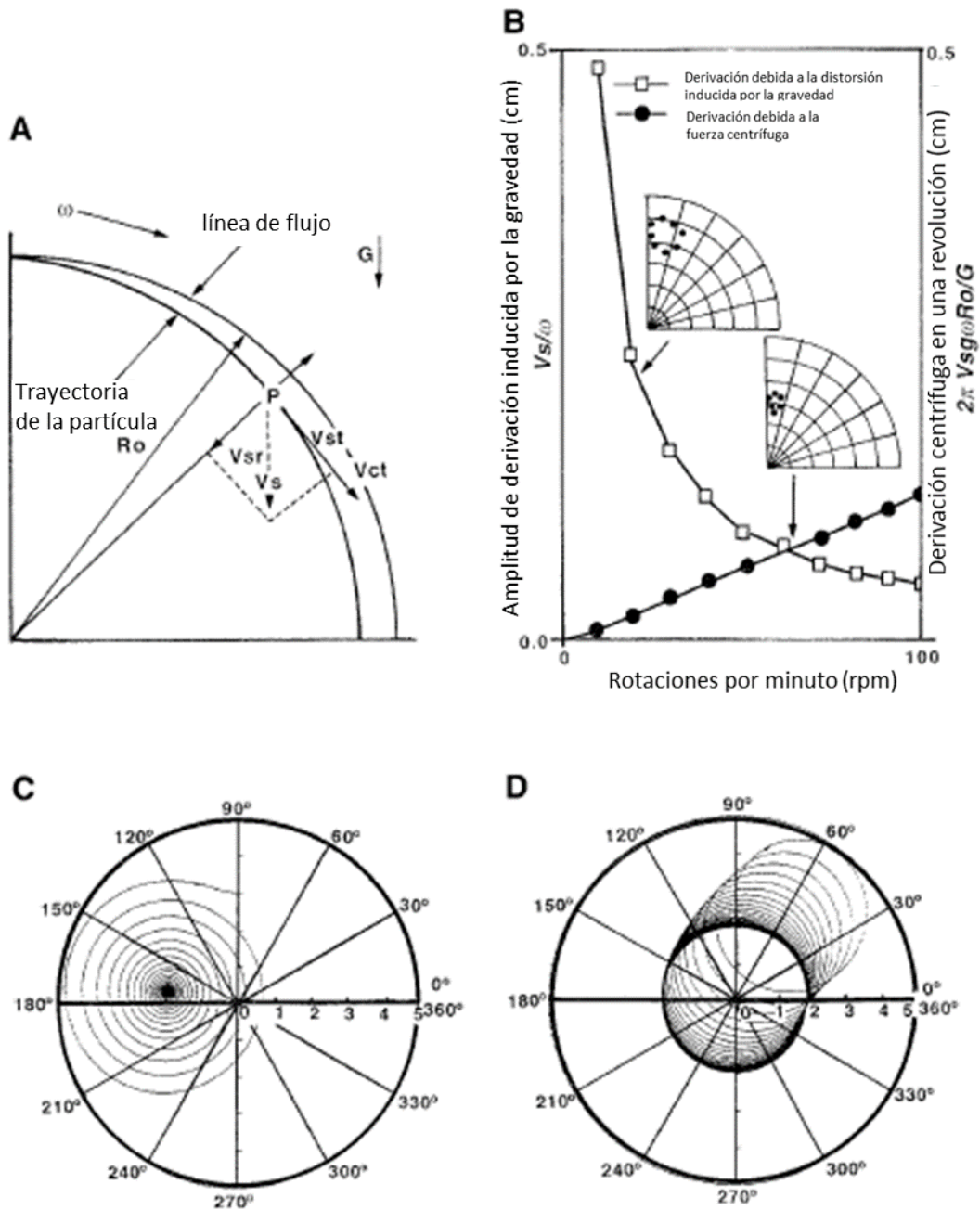


Figura 5. Parámetros de funcionamiento y límites de la función de recipiente de pared giratoria. A) Diagrama de velocidad vectorial. B) Diagrama de la magnitud de la desviación de las partículas. C) Trayectoria calculada de una partícula en el recipiente de pared giratoria en función del tiempo en un marco de referencia estacionario. D) Trayectoria calculada del agregado de la célula del vaso de pared giratoria dibujada en el marco de referencia giratorio. Imagen modificada de Hammond y Hammond 202.

Se sabe que las integrinas reclutan más de 150 proteínas, incluidas las proteínas adaptadoras de FA, las proteínas de transporte y las quinasas, a la red célula-ECM. El ECM es una malla de proteínas compleja que proporciona el andamio para la adhesión celular y el soporte mecánico. El CSK consta de tres tipos de filamentos de proteínas; actina, microtúbulos y filamentos intermedios que permiten a las células mantener su forma y resistencia mecánica. Estos elementos eventualmente orquestan varias cascadas de señalización aguas abajo para determinar el destino y el comportamiento de las células mediante la regulación de la expresión génica (Jansen et al., 2015; Kim, 2021).

La caracterización de respuesta celular a la carga mecánica (gravedad) ha sido ampliamente documentada, no así, la respuesta que se produce cuando las células se colocan en condiciones de descarga mecánica (ingravidez). Las células expuestas a un entorno de microgravedad presentan alteraciones de su forma, tamaño, volumen y adherencia celular. Estos cambios morfológicos reflejan modificaciones estructurales del citoesqueleto, específicamente en los microtúbulos y los filamentos de actina (F-actina), debido a las células perciben una disminución de la gravedad y, por tanto, una descarga mecánica (Thiel et al., 2019).

Se ha descrito cómo los ambientes de microgravedad real o simulada alteran la transcripción, traducción y organización de las proteínas citoesqueléticas. En la Figura 6 se describen las alteraciones morfológicas y fisiológicas de las células en crecimiento adherente después de la exposición a la microgravedad. En las células adherentes, los microtúbulos forman una disposición de radiales asociadas al núcleo de la célula, mientras que las fibras de actina se anclan a la membrana celular. El filamento intermedio forma una red alrededor del núcleo. En condición de microgravedad los microtúbulos se acortan y curvan, se observan menos fibras de actina, pero filamentos intermedios más condensados (Bradbury et al., 2020).

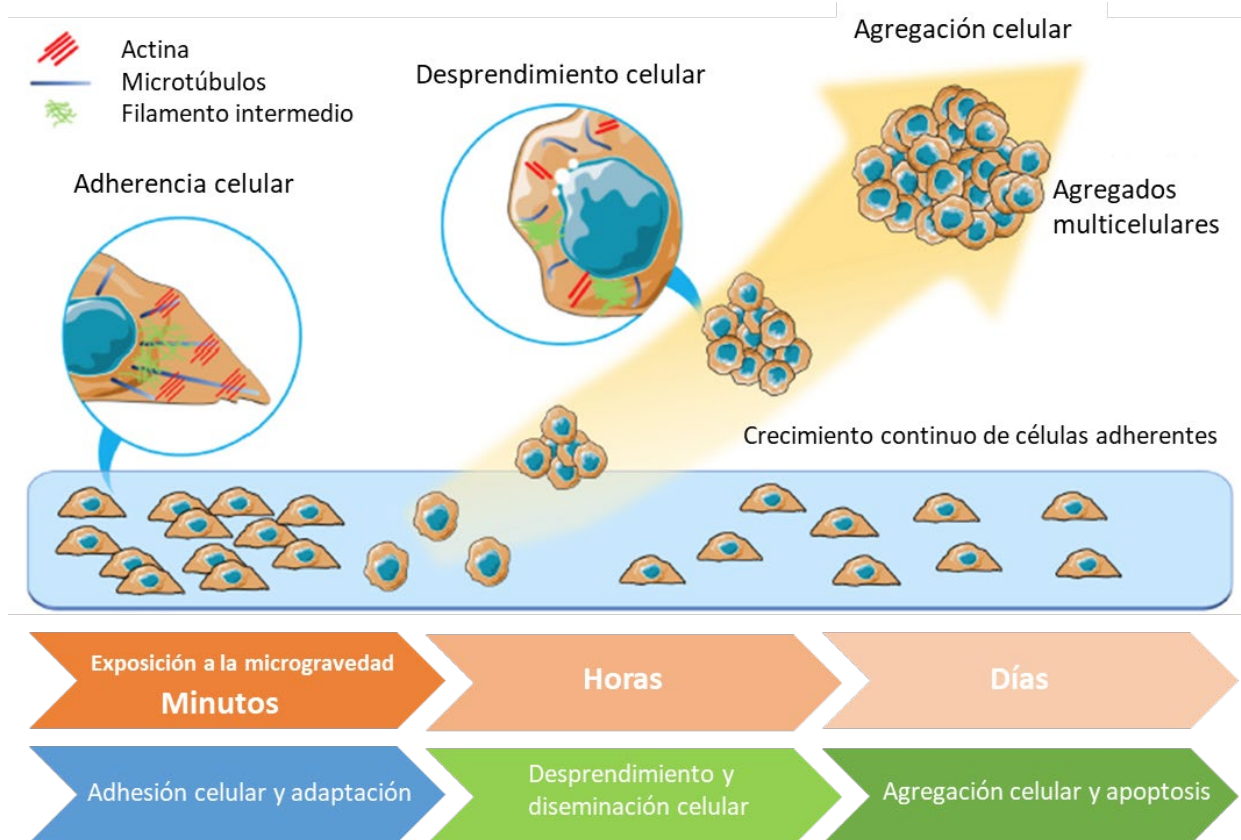


Figura 6. Alteraciones morfológicas y fisiológicas de las células en crecimiento adherente después de la exposición a la microgravedad. Imagen modificada de Bradbury 2020.

3. ANTECEDENTES

3.1 Células HEK293 como sistema de producción de biofármacos

Las células HEK293 es la línea celular humana más utilizada en la producción de biofármacos, debido a su capacidad para realizar modificaciones post-transduccionales completamente humanas. Estas células pueden cultivarse fácilmente en medios libres de suero y, aunque son de naturaleza adherente, pueden adaptarse a cultivos en suspensión. Además, tienen una velocidad específica de crecimiento relativamente alta, son susceptibles a varios métodos de transfección, y son eficientes en la producción de proteínas (Dumont et al., 2016).

Se han desarrollado clones de la línea celular HEK293 como: HEK293-H y 293-F para mejorar sus características con base en sus usos. Así, la clona 293-H ha mejorado la adherencia al cultivo en monocapa (cuando los medios suplementados con suero son utilizados) en comparación con otras líneas celulares. Otras clones de las células HEK293 incluyen la línea celular HEK293-T (293-T) y HEK293-EBNA1. La primera contiene el antígeno T del virus de simio 40T y es capaz de expresar altos títulos de vectores virales, ésta se usa para la producción de vectores retrovirales y lentivirales. Las células HEK293-EBNA1 expresan de forma estable el gen EBNA-1 del virus Epstein-Barr, controlado por el promotor del citomegalovirus demostrando una mayor tasa de crecimiento y la densidad celular máxima en relación con las células HEK293 normales (Yamaguchi et al., 2003).

Las células HEK293 se han utilizado para producir algunas vacunas y proteínas. Como ejemplo se sabe que al menos cinco agentes terapéuticos producidos en células HEK293 han sido aprobados por la FDA o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para uso terapéutico en los últimos años. Estos agentes son drotrecogina alfa (Xigris®; Eli Lilly Corporation, Indianapolis, IN), proteína de fusión del factor recombinante IX Fc (rFIXFc; Biogen, Cambridge, MA), proteína de fusión del factor recombinante VIII Fc

(rFVIII_{FC}; Biogen, Cambridge, MA), factor VIII recombinante (humana-cl rhFVIII; NUWIQ®; Octapharma, Lachen, Suiza) y dulaglutide (TRULICITY®; Eli Lilly, Indianapolis, IN). Drotrecogina alfa es una proteína C activada recombinante que fue aprobada por la FDA en 2001 y por la EMA en 2002 para el tratamiento de pacientes con sepsis grave. Las células HEK293 fueron elegidas para la producción de la Drotrecogina alfa debido a que su actividad requiere dos modificaciones post-traduccionales, la escisión del propéptido y la γ -carboxilación de residuos de ácido glutámico, que las células CHO no pueden producir de manera adecuada (Ranieri et al., 2012).

rFVIII_{FC} y rFIX_{FC} son proteínas de fusión recombinantes que fueron aprobadas por la FDA en 2014 para el control y la prevención de episodios hemorrágicos, el manejo perioperatorio y la profilaxis de rutina para prevenir o reducir la frecuencia de estos en personas con hemofilia A y B. Este biofármaco se produce en células HEK293-H donde el proceso de cultivo por lote alimentado es robusto a escalas de 200, 2000 y 15 000 litros, con el potencial para un proceso de segunda generación para alcanzar densidades celulares aún más altas, del orden de 3.5×10^7 cel/mL. Una modificación post-transduccional esencial para la actividad del FIX es gamma-carboxilación de los primeros 12 residuos de ácido glutámico en el dominio Gla por la vitamina carboxilasa γ -glutamil K-dependiente. Esta modificación facilita la unión del FIX a las membranas de fosfolípidos. Se ha reportado que las células HEK293 tienen una mayor capacidad para la γ -carboxilación que células CHO. Además, FVIII contiene seis sitios de sulfatación de tirosina potenciales, que son vitales para la funcionalidad del FVIII y la unión a factor de von Willebrand. Se ha reportado que el FVIII expresado a partir de líneas celulares humanas es completamente sulfatado (Peters et al., 2010).

El uso de células HEK293 infectadas con adenovirus recombinantes (sistema HEK293-Adenovirus) que contengan el gen de la proteína (recombinante) con interés farmacéutico, brinda una alternativa para la producción de biofármacos con glicosilación idéntica a la que presenta las proteínas endógenas del ser humano, solucionando problemas tales como las reacciones adversas asociadas a la

Tabla 4. Productos biológicos aprobados por la FDA producidos en HEK293 desde 2015. Modificado de Tan 2021.

Producto	Propiedades	Aprobación
NUWIQ®	Factor antihemofílico recombinante	2015
Voretigene neparovec (Luxturna®)	Terapia génica RPE65 basada en AAV	2017
Axicabtagene cilolucel (Yescarta®)	Terapia CAR T dirigida por CD19	2017
Tisagenlecleucel (Kymriah®)	Terapia CAR T dirigida por CD19	2017
Onasemnogene abeparovec (Zolgensma®)	Terapéutica del gen SMN basado en AAV	2019
Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®)	Terapia CAR T dirigida por CD19	2021
Idecabtagene vicleucel (Abecma®)	Terapia CAR T dirigida por BCMA	2021

3.2 IFN gamma.

El IFN gamma es una glicoproteína homodimérica formada por dos subunidades de 21 a 24 KDa, ambas codificadas por el mismo gen y asociadas de forma no covalente. Es una citocina de la familia IFN del tipo II. Éste fue originalmente descubierto como un agente antiviral y se sabe que se produce por distintos tipos de células que conforman al sistema inmune tales como CD4+, Th1, CD8+, linfocitos T citotóxicos, natural killers (NK) natural killers T (NKT), y por las células presentadoras de antígeno (APC) como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B (van Boxel-Dezaire & Stark, 2007). IFN gamma tiene una amplia gama de funciones celulares, activando vías de señalización celular en la célula diana.

Todas las células del organismo poseen receptores específicos para el IFN gamma, por lo que su efecto depende del tipo de célula. En linfocitos B, promueve la diferenciación y el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y la expresión de moléculas de clase II

del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En los linfocitos T CD4+, estimula la proliferación de las células con subtipo TH1 y bloquea la de las células TH2, favoreciendo la respuesta inmune específica mediada por células. En los neutrófilos y en los linfocitos NK, desencadena el proceso de activación, activando la respuesta inmune inespecífica. En células endoteliales, el IFN gamma induce un aumento de la expresión de selectinas en la superficie celular con el fin de facilitar la extravasación de linfocitos T del torrente sanguíneo a tejidos (McLaren & Ramji, 2009).

Sin embargo, aún con sus amplios efectos en varios tipos de células, el principal blanco del IFN gamma son los monocitos/macrófagos, sobre los que actúa como su principal activador induciendo: la expresión de genes del MHC de clase II; promoviendo la función presentadora de antígeno de los macrófagos; induciendo la expresión de la sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS); y, generando intermediarios reactivos del oxígeno que aumentan la expresión de moléculas de adhesión y de receptores FcγRI de alta afinidad, así como la síntesis y secreción de citocinas, tales como TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12, y de componentes del complemento. La inducción de la síntesis de IL-12 representa un mecanismo de retroalimentación positivo en el contexto de la inmunidad específica mediada por células, ya que esta interleucina actúa como un potente inductor de la proliferación de linfocitos T CD4+ del subtipo TH1 (Billiau & Matthys, 2009).

El IFN gamma puede ejecutar directamente efectos anti proliferativos en una amplia variedad de tumores. El desarrollo de tumores sólidos requiere de la formación vasos sanguíneos para crecer; este proceso se denomina angiogénesis. Existen moléculas proangiogénicas producidas por los tumores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Sin embargo, la inducción de quimiocinas como IP-10 en células tratadas con IFN gamma ejerce actividad anti-angiogénica bloqueando la neovascularización del tumor. Otras quimiocinas anti-angiogénicas inducidas por IFN gamma son MIG e I-TAC, las cuales son quimioatrayentes de células T y NK que se infiltran en el tumor, también se ha

determinado que la IL-12 activa la producción de IFN gamma para inducir la secreción de quimiocinas (Rodriguez-Vita & Lawrence, 2010). Las citocinas han sido ampliamente estudiadas por su capacidad inmunoestimulante; esta capacidad las hace moléculas terapéuticas atractivas para tratar diversas enfermedades. Dentro de este grupo se encuentra el IFN gamma (Costa et al., 2014). Las funciones inmunoestimulantes del IFN gamma han sido aplicadas para tratar diversas enfermedades, una de ellas es la enfermedad granulomatosa crónica , la cual ha sido tratada mediante la administración de IFN gamma recombinante intramuscular o intravenosa (Obeid & Bauvois, 2006). El uso de IFN gamma como agente inmunomodulador y apoptótico ha sido exitoso en modelos experimentales y en pacientes con diferentes enfermedades (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto del INF gamma recombinante en modelos experimentales. El INF gamma, es una molécula inmunomoduladora que puede ser usada para tratar diversas enfermedades.

Modelo	Enfermedad	Efecto	Referencia
<i>In vitro</i>	Hepatitis B y C	Eficiente para suprimir la replicación viral.	(Ughachukwu et al., 2016)
<i>In vitro</i>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo I	Contribuye a la destrucción de las células beta por la producción de oxido nítrico.	(Meenakshi et al., 2016)
Ratones	Infecciones bacterianas	Aumenta la activación de macrófagos y reduce la intensidad de la infección.	(Pereiro et al., 2016)
Ratones	Infecciones parasitarias	Confiere resistencia a la infección.	(Lykens et al., 2010)
Ratones	Tumores inducidos con células tumorales.	Regresión tumoral	(Mauldin et al., 2016)
Humanos	Enfermedades pulmonares	Mejoría de signos y síntomas.	(Briend et al., 2017)

3.5 Adenovirus

Los adenovirus humanos están asociados con enfermedades de las vías respiratorias, ojos e intestino. Tipos específicos de adenovirus causan enfermedades en el tracto urinario, hígado, amígdalas y/o adenoides. Las infecciones por adenovirus pueden ser asintomáticas, pero también pueden ser letales, especialmente en individuos inmunocomprometidos.

El virión (90-100 nm de espesor) carece de una envoltura lipídica e incluye una cadena de ADN de doble cadena que contiene 35,000 – 37,000 pares de bases. La cápside icosaédrica se construye principalmente a partir de proteínas de hexón, proteínas de base pentónica y proteínas de fibra. Estas proteínas encapsulan el ADN viral y se mantienen unidas principalmente por la proteína IIIa (pIIIa), la proteína IX (pIX) y otras proteínas de anclaje. En cada una de las 12 esquinas, la proteína de base pentónica ancla la fibra que sobresale al virión. Las tres proteínas de la cápside están involucradas durante su adhesión y/o entrada en las células hospederas (Reddy & Nemerow, 2014).

Las principales ventajas de los vectores adenovirales son: pueden producirse en títulos virales altos sin comprometer la producción; transducen eficientemente células en división y en reposo; tienen un comportamiento episomal permaneciendo de manera independiente en el núcleo. Se observa que, en varios casos, el éxito del uso de vectores adenovirales ha sido moderado, principalmente debido a la mala transducción, causada en parte por la respuesta inmune innata y/o preexistentes que eliminan de la circulación los vectores basados en Ad5 administrados por vía intravenosa y, en parte, por la ineficacia de la orientación vectorial. Se han hecho intentos por evadir la respuesta inmune usando vectores "gutless" o vectores blindados con polietilenglicol. La ineficacia de los vectores basados en Ad5 se debe principalmente a la unión con moléculas del hospedero, como los factores de coagulación, que dirigen rápidamente el vector hacia las células hepáticas. Ésta y otras interacciones entre las moléculas del hospedero y el adenovirus explican, al

menos en parte, el tropismo de los adenovirus silvestres y sus homólogos recombinantes (Xiang et al., 2015).

Los adenovirus son el vector más utilizado en ensayos clínicos: cáncer en la próstata, pulmones, cabeza y cuello, sangre, piel, sistema nervioso central, ovarios, mama, riñones, y otros tipos de células/tejido, así como para tratar enfermedades cardiovasculares: enfermedades de las arterias, angina e isquemia. Finalmente, los adenovirus también se utilizan como vectores de vacunas para tratar o prevenir infecciones (Arnberg, 2012).

El éxito de los vectores adenovirales (en su mayoría derivados del Ad5 humano) se ha mejorado con el tiempo debido a las modificaciones genéticas que se han realizado en su genoma. Para establecer la seguridad en el uso, las primeras modificaciones se hicieron eliminando los genes esenciales de replicación viral. Los adenovirus de primera generación son aquellos a los que se les ha deletado los genes reguladores E1a y E1b e los primeros factores reguladores transcripcionales que se producen durante el ciclo de replicación viral. La eliminación de estos genes dio lugar a los adenovirus con una capacidad inicial de clonación de transgénesis de 5.2 kb buscando mejorar el sistema y aumentar la capacidad de clonación y continuar disminuyendo la capacidad de replicación viral. La segunda generación describe vectores en los que se eliminaron genes no estructurales (E2/E3/E4) además del gen E1 original ausente en los vectores de primera generación. Si bien la segunda generación de vectores demostró una mayor capacidad de clonación y una reducción de la citotoxicidad, aun así, desencadenaron respuesta inmune *in vivo* que dio lugar a la reducción de la transgénesis (Lee et al., 2017).

Se desarrolló una tercera generación de AdVs, denominados vectores adenovirales de alta capacidad (HC-AdVs), también conocidos como “*gutless*” o AdVs dependientes de ayudantes (HD-AdVs). El HC-AdV es despojado de todas las secuencias de codificación viral, resultando en un vector con sólo 50 y 30 ITRs además de una señal de empaquetado, proporcionando así una mayor capacidad para las secuencias de

clonación transgénica (36 kb). La estructura de la HC-AdV minimiza la citotoxicidad, lo que permite la expresión prolongada de genes terapéuticos, lo que convierte a la HC-AdV en el AdV más prometedor para su uso en terapia génica (Fernandes et al., 2015). Actualmente, en el mercado ya se encuentran productos provenientes de vectores adenovirales para terapia génica. Gendicine es el primer biofármaco autorizado para utilizarse como agente en terapia génica para el tratamiento del cáncer (Su et al., 2015). Es un adenovirus humano serotipo 5, modificado genéticamente, en el que se ha eliminado la región E1 sustituyéndola por el gen que codifica el gen supresor de tumores p53. Este adenovirus ha sido aprobado para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello en China. También se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de varios otros tipos de cáncer. Se compone de partículas víricas Ad5-p53 recombinantes, de replicación incompetente, que se basan en adenovirus de serotipo 5 en el cual la región E1 ha sido sustituida por el cDNA del gen supresor humano de tipo salvaje de tumores p53 (Chen et al., 2014).

3.6 Redes neuronales artificiales para el modelamiento de cultivos celulares

Las Redes Neuronales Artificiales (RNA) se inspiran en las interconexiones biológicas de las neuronas del cerebro. Éstas originalmente tenían como objetivo comprender el funcionamiento del cerebro y del sistema nervioso modelando matemáticamente la transferencia de señales entre grupos neuronas, culminando los modelos matemáticos simplificados de una neurona artificial. El uso de las RNA se ha ampliado rápidamente, construyendo redes computacionales de neuronas artificiales con el objetivo abstracto de imitar la capacidad humana de "aprender" a partir de datos de entrenamiento para crear asociaciones generalizadas que permitieran clasificar correctamente datos de prueba. Dado que las RNA no podían comparar su complejidad con Las redes neuronales biológicas se determinó usar el prefijo "artificial" (Berg & Nyström, 2018; Mendez et al., 2019).

La RNA más común es la red neuronal feed-forward. La red está representada por múltiples capas de neuronas basado en proyecciones (Figura 7). Estas capas neuronales incluyen una capa de entrada, una o más capas ocultas y una capa de salida, con neuronas conectadas por pesos sinápticos. Cada neurona representa una función de transferencia que consta de dos pasos secuenciales. En primer lugar, una función de suma calcula la suma ponderada de las neuronas de entrada compensada por un valor constante (sesgo). En segundo lugar, una función de activación transforma las sumas utilizando una transformación lineal o no lineal (como la tangente hiperbólica y la sigmoide). Durante el entrenamiento del modelo de RNA, los pesos entre cada capa de neuronas se optimizan iterativamente en un ciclo de dos fases: propagación hacia adelante a través de la red, tras lo cual se calcula un término de error basado en la diferencia entre los resultados objetivo y los reales, y retropropagación para ajustar los pesos (Berg & Nyström, 2018; Gupta et al., 2003; Mendez et al., 2019). Este método único de optimización de los parámetros del modelo utilizado para las RNA se denomina retropropagación, conceptualmente sencillo, permite la flexibilidad de las estructuras de las RNA, de una a múltiples capas ocultas, estas últimas denominadas redes neuronales profundas o aprendizaje profundo (Wong et al., 2018).

Los cultivos de células animales se caracterizan por comportamientos no lineales muy complejos, difícilmente simulados mediante modelos analíticos. Las Redes Neuronales Artificiales, si bien son modelos de caja negra, poseen capacidades de aprendizaje y generalización que podrían conducir a mejores resultados. La implementación de un enfoque computacional novedoso, algoritmos de aprendizaje automático, incluido el perceptrón multicapa (MLP) como red neuronal artificial (RNA) y la regresión de vector de soporte (SVR), para modelar procesos que implican el crecimiento celular y su metabolismo resultan en una herramienta con gran potencial en la producción de biofármacos. Las RNA son ampliamente utilizadas en la ciencia de los materiales, pero también se utilizan en estudios biológicos y médicos. Por ejemplo, Antonakoudis y colaboradores establecieron una metodología combinada de un modelo metabólico

estequiométrico de células CHO y una red neuronal artificial que describe el proceso de glicosilación de la proteína recombinante (Antonakoudis et al., 2021).

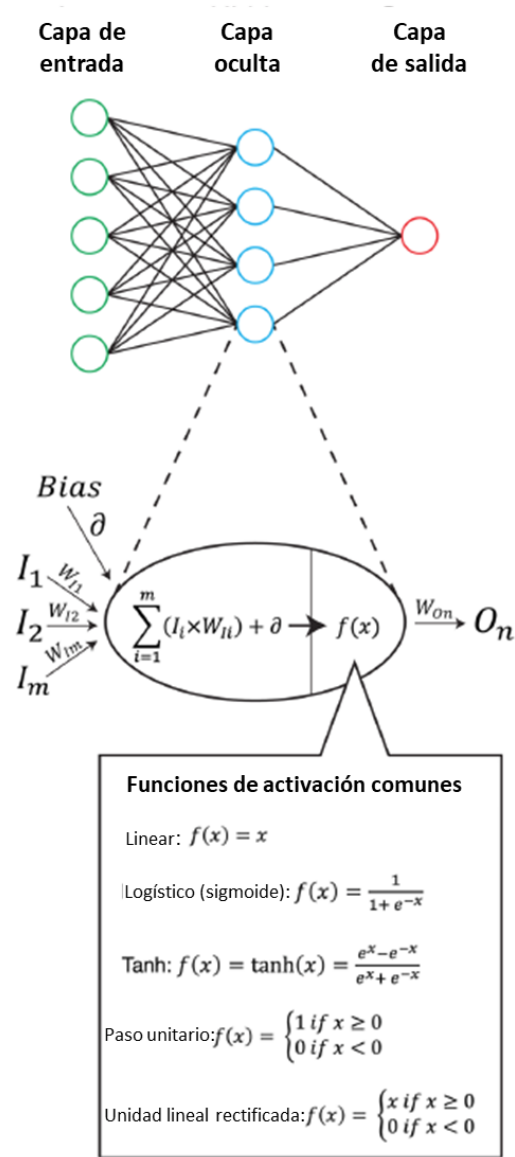


Figura 7. Representación gráfica de una RNA. Cada círculo representa una neurona en cada capa, y las flechas representan el peso sináptico entre la salida de una neurona y la entrada de otra neurona. Cada neurona representa una función de transferencia simple dividida en dos etapas: la suma de las entradas seguida de una función de activación. Imagen modificada de Mendez et al., 2019.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la microgravedad simulada y terrestre en el sistema transitorio de producción de proteínas recombinantes HEK293-Adenovirus/INF gamma mediante el análisis de la productividad del cultivo y de la calidad y eficacia de la proteína recombinante y del vector adenoviral para proponer nuevas estrategias de mejoramiento de cultivo.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar experimentalmente la condición de microgravedad simulada en el sistema HARV para establecer las condiciones de operación adecuadas para el cultivo celular.
- Caracterizar el crecimiento de células HEK293 en cultivos sin infectar e infectados con vectores adenovirales que expresen IFN gamma, en ambientes con gravedad terrestre y microgravedad simulada, para determinar cuál es la mejor condición de cultivo.
- Cuantificar la expresión de la proteína de IFN gamma por ELISA, en ambientes con gravedad terrestre y en microgravedad simulada, para determinar si la condición de microgravedad simulada favorece la expresión de IFN gamma.
- Cuantificar la producción de vectores adenovirales que expresan IFN gamma mediante la determinación de partículas infectivas para determinar si la condición de microgravedad simulada favorece la producción de vectores adenovirales.
- Cuantificar metabolitos y subproductos por medio del analizador bioquímico (YSI) para establecer las cinéticas de consumo y producción comparando los rendimientos específicos en microgravedad y en gravedad terrestre.
- Implementar un método de redes neuronales artificiales para modelar matemáticamente los datos experimentales obtenidos en condición de gravedad terrestre y microgravedad simulada.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

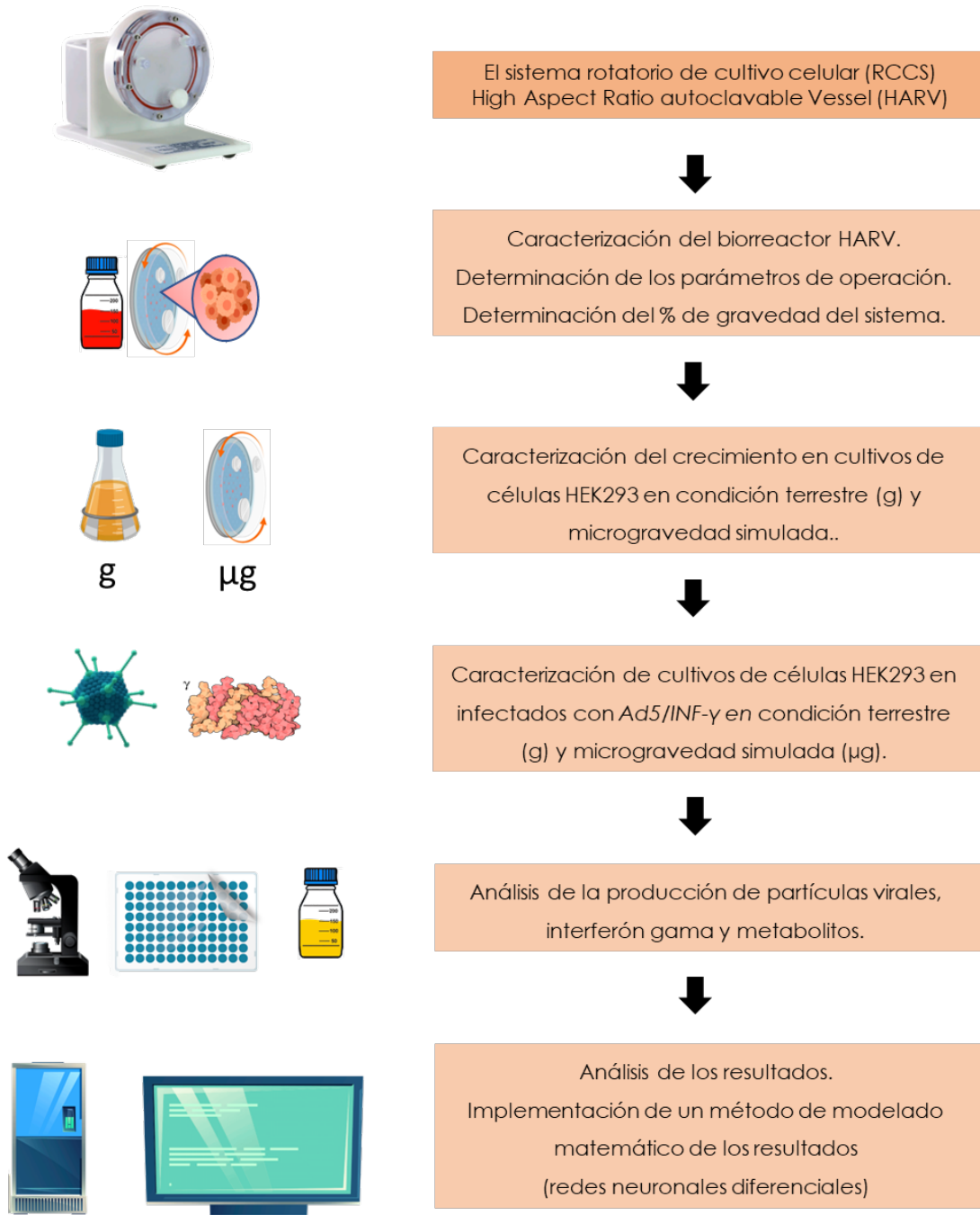


Figura 8. Estrategia experimental.

8.1 Cultivo de células HEK293

La línea celular de riñón embrionario humano (HEK293) se obtuvo de la colección de cultivos ATCC (nº de catálogo ATCC CRL-1573). Inicialmente, las células HEK293 se cultivaron en DMEM F12 (Gibco, nº de catálogo 12500062) y un 10% de FBS (byProducts Batch nº FBS19003, nº de catálogo 90020); a continuación, se adaptaron al medio Excell 293 sin suero (Sigma, nº de catálogo 14571C) suplementado con 4 mM de glutamina (Sigma, nº de catálogo G8540). Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

8.2 El sistema rotatorio de cultivo celular (RCCS)

La condición de microgravedad se simuló en un sistema de cultivo celular rotatorio (RCCS-1), tipo High aspect ratio autoclavable vessel (HARV) (Houston, Texas 77054 EE.UU.). El dispositivo tiene un diámetro de 99.06 mm, una profundidad de 6.33 mm y un volumen total de 50 mL. La velocidad de rotación para los cultivos de células HEK293 se determinó en 25 rpm, la operación del sistema se realizó dentro de una incubadora (Thermo Fisher Modelo Serie 3 con camisa de agua) a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad en un laboratorio BSL2.

8.3 Evaluación de las condiciones de microgravedad en el montaje experimental

Las condiciones de microgravedad durante los experimentos se evaluaron mediante un enfoque de procesamiento de imágenes. Se grabaron las trayectorias de los esferoides de células HEK293 en el interior del reactor para estimar el componente de gravedad resultante durante la rotación. Se utilizó una cámara de vídeo CCD integrada (POXXXJS2-3, 13 megapíxeles) de un teléfono móvil (Huawei Psmart) para registrar las trayectorias de los esferoides. La cámara y el reactor se colocaron dentro de la cabina de bioseguridad, a 0,3 metros de distancia y perpendicularmente al

plano de la imagen. El biorreactor se cargó con células HEK293 teñidas con colorante violeta cristal a una densidad de 2×10^5 células/mL en un volumen de 50 mL de medio de cultivo, en condiciones de 5, 10, 15, 25 y 30 rpm. Los experimentos se grabaron y los vídeos se guardaron en formato MP4 para procesarlos sin conexión. La representación esquemática de las trayectorias se muestra en la Figura 1. Posteriormente, los vídeos se descompusieron en fotogramas (archivos de imagen, formato jpg), de acuerdo con la resolución temporal de la cámara a un intervalo de un tercio de segundo ($1/3$ s) entre ellos. Los elementos de cada imagen se escalaron a las dimensiones reales en el marco del biorreactor; se tomó el radio de 9.96 cm del biorreactor para establecer la relación píxel/cm. Para realizar este proceso se utilizó el software de código abierto Kinovea 0.8.15 e ImageJ 1.53. En cada fotograma, se identificaron manualmente los centros esferoidales correspondientes y, a continuación, se registró la trayectoria de cada punto a lo largo de cada ciclo con un par de coordenadas en la imagen etiquetadas como $C_i(x(n), y(n))$, donde C_i corresponde al centro geométrico del esferoide i -ésimo y $x(n), y(n)$ corresponden a las coordenadas en cada fotograma n -ésimo, dadas en metros. Se seleccionó una trayectoria completa durante una revolución para determinar la velocidad lineal media en cada fotograma $v(n)$ y la aceleración ($a(n)$), dadas por las siguientes relaciones para la coordenada x $v_x = (x(n) - x(n-1)) / (t(n) - t(n-1))$, y $a_x = (v_x(n) - v_x(n-1)) / (t(n) - t(n-1))$, donde $t(n)$ y $t(n-1)$ corresponden al tiempo registrado para la captura de n fotogramas y el fotograma anterior ($n-1$), expresiones análogas se utilizaron para la determinación de la componente $v_y(n)$ y $a_y(n)$. Se calcularon la magnitud y la dirección de $v(n)$ y $a(n)$ y se representaron vectorialmente sobre el plano de la imagen. Para estimar la fracción de aceleración de la gravedad sobre cada esferoide en cada fotograma n se realizó el siguiente cálculo fracción de gravedad $(n) = (a_Y(n) * 100) / (-g)$ donde $g = 9,81$ m/s².

8.4 Caracterización del cultivo de células HEK293 en condiciones de microgravedad simulada (HARV) y en condiciones de gravedad terrestre (cultivos en matraz agitado)

Cultivo celular. La cinética de crecimiento de HEK293 se estableció en un entorno de microgravedad simulada utilizando 50 mL de medio Excell293 libre de suero con un inóculo de 2×10^5 células/mL, y se mantuvo a 37 °C, 5% CO₂; la velocidad de rotación del HARV fue de 25 rpm en todos los experimentos. Estos cultivos se compararon con cultivos de células HEK293 en gravedad terrestre considerando el matraz agitado a 100 rpm en una incubadora con agitador orbital con un volumen de 50 mL de medio Excell293 libre de suero con un inóculo inicial de 2×10^5 células/mL con una velocidad de rotación de 25 rpm a 37 °C y 5% CO₂.

Recuento celular y viabilidad. Se determinaron las células totales y viables por mL mediante la técnica de exclusión con azul tripano (Gibco, Cat. no. 15250061; Freshney, 2010).

Medición de nutrientes. La glucosa, la glutamina, el lactato y el glutamato se midieron en un analizador bioquímico YSI (YSI modelo 2900).

8.5 Cinética de infección por IFN gamma-adenovirus 5

Cultivos de células HEK293 en ambientes de gravedad terrestre y microgravedad fueron infectados por IFN gamma-adenovirus 5 utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 5 y una densidad celular de 0.6×10^6 cél/mL, dichas condiciones fueron previamente establecidas por (Sosa 2016) observándose que los mejores títulos se obtuvieron con estos valores de densidad celular y multiplicidad de infección. La expresión de IFN gamma y los títulos de adenovirus se muestrearon a las 72 h, 96 h y 120 h. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C, los pellets secos a -80°C para su posterior análisis. La expresión de IFN gamma se midió mediante el kit ELISA platino

(Invitrogen BMS228). El título de adenovirus se determinó por el método de Reed y Muench (Ramakrishnan, 2016) (Ramakrishnan, 2016).

8.6 Identificación dinámica no paramétrica mediante redes neuronales diferenciales

Hipótesis de identificación y conjunto de datos experimentales. Para la identificación no paramétrica del proceso, el sistema de cultivo celular en condiciones de funcionamiento por lotes (sin flujo de entrada) se representó mediante la clase general de sistemas no lineales continuos, establecidos por el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\frac{dx(t)}{dt} = f(x(t)) + \xi(t) \quad (1)$$

donde $x(t) \in R^n$, es el vector de estado en el tiempo $t \geq t_0$ con una condición inicial dada $x(t_0)$. En el caso particular de la cinética de crecimiento: $x(t) \in R^5$ para experimentos no infectados, y $x(t) \in R^7$ para el experimento infectado, con componentes $x_1(t)$ =concentración celular [célula/mL], $x_2(t)$ =producción viral [ufp/mL] y $x_3(t)$ =producción de IFN, en el momento t actual. $\xi(t) \in R^n$ es un vector aditivo acotado de ruido determinista que afecta al vector de estado y que considera el posible ruido experimental. Los valores experimentales de cada variable en el vector de estado $x(t) \in R^n$ donde se registran fuera de línea y se preprocesan mediante regresión polinómica de ajuste simple para construir un conjunto de datos de series temporales continuas. Este conjunto de datos se utiliza para estimar el modelo dinámico dado por ecuaciones diferenciales adaptables como se describe a continuación.

Estructura de modelado de las redes neuronales diferenciales. El siguiente enfoque se basó en la metodología presentada en Gradilla-Hernández et al., (2020). Una Red Neuronal Diferencial (DNN) es una ecuación diferencial no lineal adaptativa utilizada para aproximar el lado derecho $f(x(t))$ del sistema (1), dicha aproximación depende de los parámetros variables en el tiempo (pesos, $W(t)$) que deben ser ajustados por una

ley de aprendizaje concreta. Este conjunto de ecuaciones diferenciales consta de dos partes: una sección lineal representada por una matriz de Hurwitz $A \in R^{n \times n}$ con componentes constantes, y una sección no lineal adaptable con multiplicadores de funciones sigmoideas variables en el tiempo $\sigma(x(t))$ (vector de funciones de activación), esto es:

$$\frac{d\hat{x}(t)}{dt} = A\hat{x}(t) + W(t)\sigma(\hat{x}(t)) \quad (2)$$

Donde $\hat{x} \in R^n$ es el vector de estado estimado por la DNN, $A \in R^{n \times n}$, $W \in R^{n \times p}$, $\sigma(\cdot) \in R^{p \times 1}$. Tanto los parámetros constantes como los variables en el tiempo deben ajustarse adecuadamente para garantizar una aproximación correcta al estado entre $x(t)$ y $\hat{x}(t)$. La matriz $W(t)$ proporciona la capacidad de adaptación de la DNN y viene dada por la solución del siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dW(t)}{dt} = -(2k)^{-1}P\Omega(\hat{x}(t), \hat{x}(t-h(t))\sigma^T(\hat{x}(t)) + (2k)^{-1}P\hat{W}(t) \quad (3)$$

$$(3)\Omega(\hat{x}(t), \hat{x}(t-h(t))) = 2\delta(t-h(t)) + \hat{W}(t)\sigma(\hat{x}(t))$$

Donde $\delta := \hat{x}(t) - x(t)$ es el error de identificación $\hat{W}(t) = W(t) - \hat{W}$ para un \hat{W} , $k > 0$ es la tasa de adaptación y P es una matriz con las siguientes características: $P \in R^{n \times n}$, $P = P^T$.

El conjunto de parámetros del identificador DNN para experimentos no infectados ($x(t) \in R^5$) se selecciona como: matriz lineal estable $A = -0.03 \times I^{5 \times 5}$ la matriz de pesos adaptable como matriz diagonal:

$$W_1(t) = [w_{11}(t) \ 0 \ 0 \ 0 \ 0; \ 0 \ w_{22}(t) \ 0 \ 0 \ 0; \ 0 \ 0 \ w_{33}(t) \ 0 \ 0; \ 0 \ 0 \ 0 \ w_{44}(t) \ 0; \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ w_{55}(t)],$$

y el vector de funciones sigmoideas

$\sigma(\hat{x}(t)) = [\sigma_1(\hat{x}_1(t)) \ \sigma_2(\hat{x}_2(t)) \ \sigma_3(\hat{x}_3(t)) \ \sigma_4(\hat{x}_4(t)) \ \sigma_4(\hat{x}_4(t))]$, entonces la estructura particular de identificación no paramétrica (modelo dinámico) está dada por:

$$= \begin{bmatrix} -0.03 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -0.03 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -0.03 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -0.03 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -0.03 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{x}_1(t) \\ \hat{x}_2(t) \\ \hat{x}_3(t) \\ \hat{x}_4(t) \\ \hat{x}_5(t) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} w_{11}(t) & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & w_{22}(t) & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & w_{33}(t) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & w_{44}(t) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & w_{55}(t) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sigma_1(\hat{x}_1(t)) \\ \sigma_2(\hat{x}_2(t)) \\ \sigma_3(\hat{x}_3(t)) \\ \sigma_4(\hat{x}_4(t)) \\ \sigma_5(\hat{x}_5(t)) \end{bmatrix} \quad (4)$$

Esta estructura también se amplía para el caso de experimentos infectados a dimensiones propias ($x(t) \in R^7$). El modelo obtenido tras el ajuste de (4) es un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias que representan la tasa de cambio de cada variable considerada en el proceso. Es importante señalar que este enfoque no es un análisis de regresión estático a lo largo del tiempo, sino un modelo dinámico y adaptable en cualquier t .

8.7 Estadística

Los experimentos se realizaron por triplicado ($n=3$) y se calculó la media. El porcentaje de gravedad se calculó a partir de los marcos de tres experimentos independientes (3 cultivos en el biorreactor HARV). Las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Cada variable se aproxima mediante regresión polinómica simple para crear una serie temporal continua de datos y se fijó un criterio de bondad de ajuste superior a 0,95. La estructura de la función polinómica no se tiene en cuenta en el análisis y se utiliza exclusivamente como generador de datos continuos.

9. RESULTADOS.

9.1 Establecimiento de los parámetros de operación del dispositivo de microgravedad simulada HARV

Para establecer los parámetros iniciales de operación del sistema de microgravedad simulada High Aspect Ratio Vessel (HARV) se utilizaron valores previamente reportados en la literatura (REF) para posteriormente corroborarlos con resultados experimentales. Utilizando el módulo de dinámica de fluidos computacional (CFD) del programa COMSOL Multiphysics se midió la distribución de la tensión de cizallamiento en el interior del HARV utilizando un estudio de flujo monofásico laminar con base a la viscosidad del medio de cultivo DMEM F12. Las revoluciones de operación del sistema reportadas van de 10 a 30 rpm dependiendo el tipo de célula, del uso de microacarreadores o de andamios de anclaje (Kwon, Devarakonda, Sankovic, & Banerjee, 2008). El estudio se realizó a 10 rpm y 20 rpm con valores de viscosidad de 0.69 cP y una densidad de 0.9933 g/cm³ a 37 °C. La Figura 8 muestra la resolución del estudio, observando un valor de 20x10⁻⁵ dPa para la velocidad de 10 rpm y 10x10⁻⁴ dPa para 20 rpm. La diferencia observada de casi un orden de magnitud indica que a mayores revoluciones por minuto mayor la fuerza de cizallamiento en las paredes internas del recipiente de cultivo.

Posteriormente, se realizó un análisis de los vectores de velocidad de flujo a diferentes rpm en el sistema HARV (Figura 9A). La velocidad de los vectores es medida en mm/s y se observa que a 5 y 10 rpm dichos vectores no se distribuyen uniformemente y tienden a colisionar con las paredes del recipiente. Para el rango de velocidades de rotación de 15-25 rpm estos vectores se equilibran más eficientemente, no así, para los valores de 30 rpm donde se observa mayor estrés hidrodinámico donde los vectores de velocidad se concentran más cerca de las paredes internas del HARV.

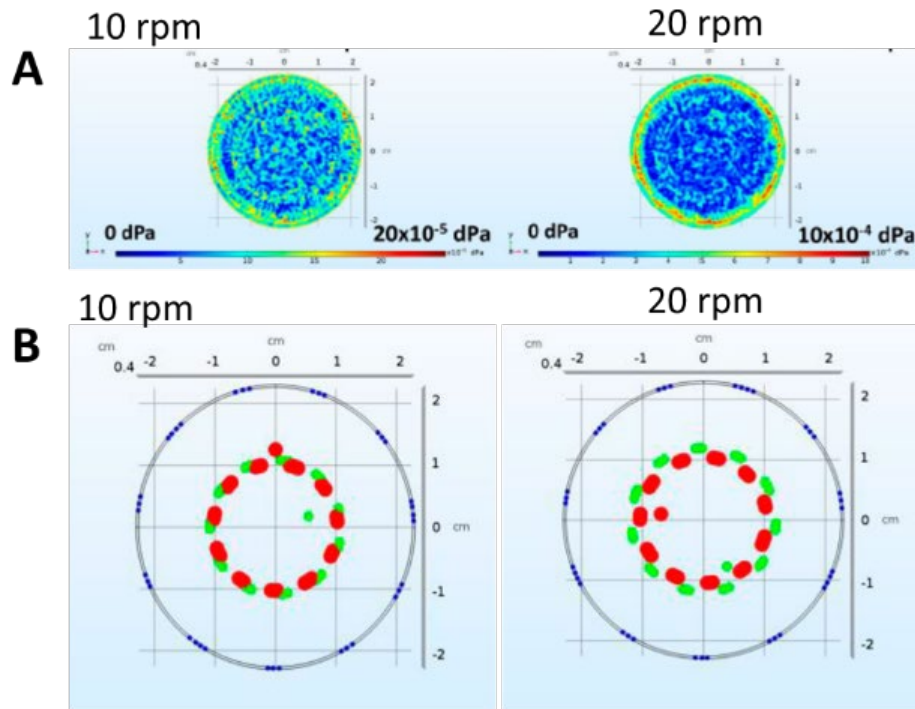


Figura 9 . Simulación de cultivo del dispositivo HARV. A) Análisis de dinámica de fluidos computacional (CFD) para los valores de 10 rpm y 20 rpm B) Trazado de partículas para los valores de 10 rpm y 20 rpm para partículas de 50 μm (azul) 100 μm (verde) y 200 μm (rojo).

El establecimiento de un modelo de simulación del biorreactor HARV utilizando la dinámica de fluidos (CFD), el trazado de partículas y la determinación de la velocidad de los vectores de flujo fue demostrado experimentalmente en la Figura 9, donde se montó un experimento utilizando como fluido 50 mL de agua destilada y como fase sólida partículas de silica gel con un tamaño de 66 a 200 μm , las cuales fueron teñidas con cristal violeta; con una densidad masa correspondiente a 2×10^5 cel/mL para poder observar el posicionamiento de las partículas. La Figura 9A representa la dirección teórica representada por vectores del experimento para cada velocidad de rotación. Como se observa en la figura 9B, a 5 rpm las partículas se mantienen en la pared del recipiente siendo esta velocidad de rotación insuficiente para distribuir las partículas en el total del sistema; lo mismo ocurre a 10 rpm, pues la mayor parte de las partículas se encuentra en la misma posición. A 15 rpm las partículas comienzan a

distribuirse al centro del recipiente y en 25 rpm se observa que una proporción importante se encuentra rotando en equilibrio hacia el centro del HARV. Si bien a la velocidad 30 rpm las partículas se encuentran rotando éstas se alejan del centro y se mantienen más cerca de las paredes, con lo que se observó en la simulación donde existe un mayor estrés hidrodinámico lo que podría afectar la viabilidad de los cultivos.

La Figura 9C representa el experimento donde se colocaron 2×10^5 cel/mL de células HEK293 teñidas con cristal violeta en 50 mL de medio de cultivo libre de suero y se procedió a monitorear el comportamiento a diferentes rpm. Las velocidades de 5 rpm y 10 rpm muestran nuevamente no ser suficientes para poder mantener al centro del recipiente las células, aún a 15 rpm no se aprecia que las células se dispersen adecuadamente. 25 rpm es la velocidad de rotación que mejor mantiene las células en rotación al centro del recipiente y a 30 rpm la velocidad aleja las células del centro exponiéndolas a un mayor estrés hidrodinámico.

Lo anterior demuestra que el rango de operación de velocidades de rotación es del rango de 15 rpm a 25 rpm permitiendo que las células roten al centro alcanzando el equilibrio de la fuerza de Coriolis, centrífuga y una fuerza gravitacional reducida cumpliendo con las condiciones de un ambiente de microgravedad simulada.

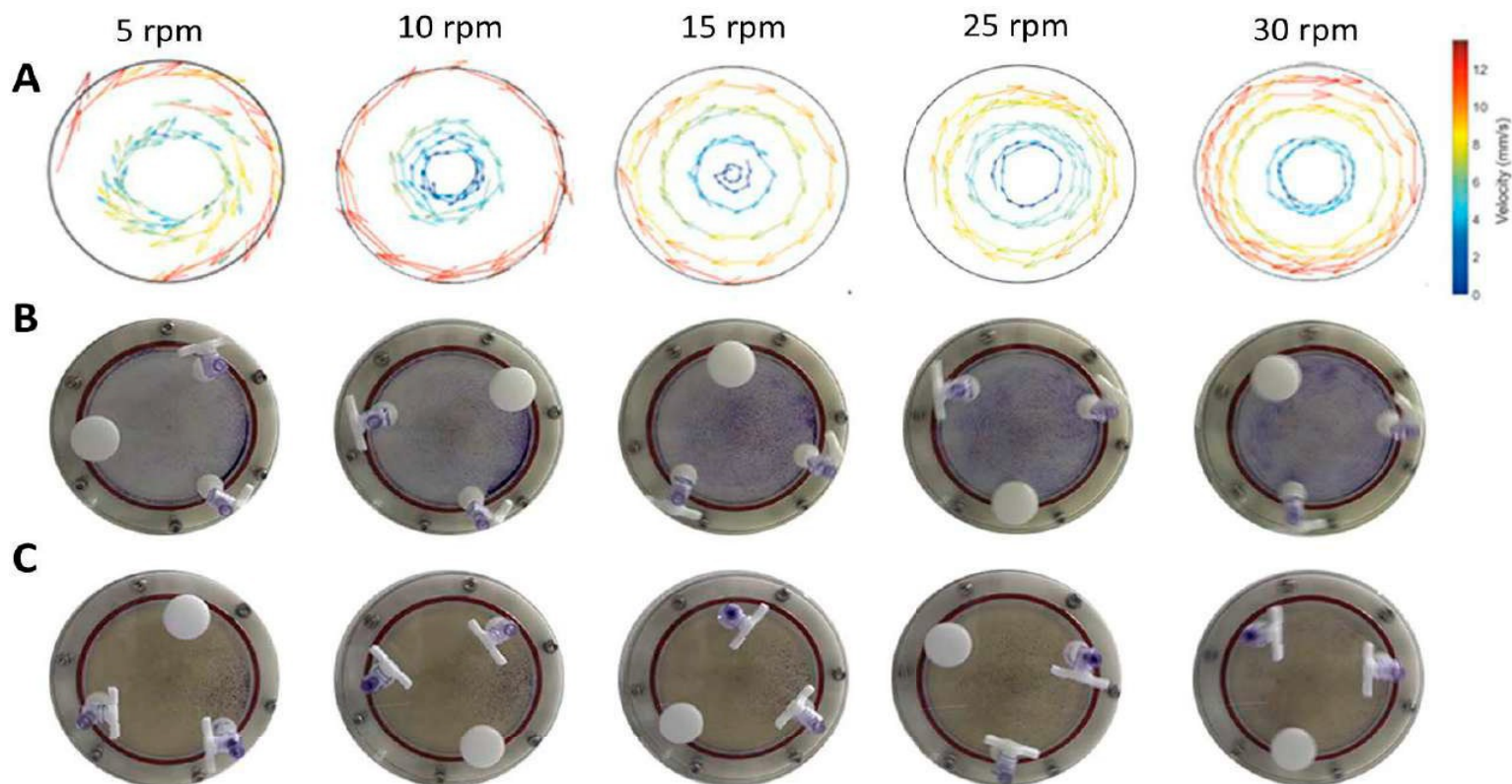


Figura 10. Establecimiento de las velocidades de rotación para el cultivo de células HEK293 en el biorreactor HARV para simular una condición de microgravedad. A) Análisis de los vectores de velocidad de flujo B) Biorreactor HARV, fase líquida: agua destilada, fase sólida: sílica gel teñida con cristal violeta C) Biorreactor HARV fase líquida: medio de cultivo libre de suero, fase sólida: células HEK293 densidad celular: 2×10^5 cel/mL.

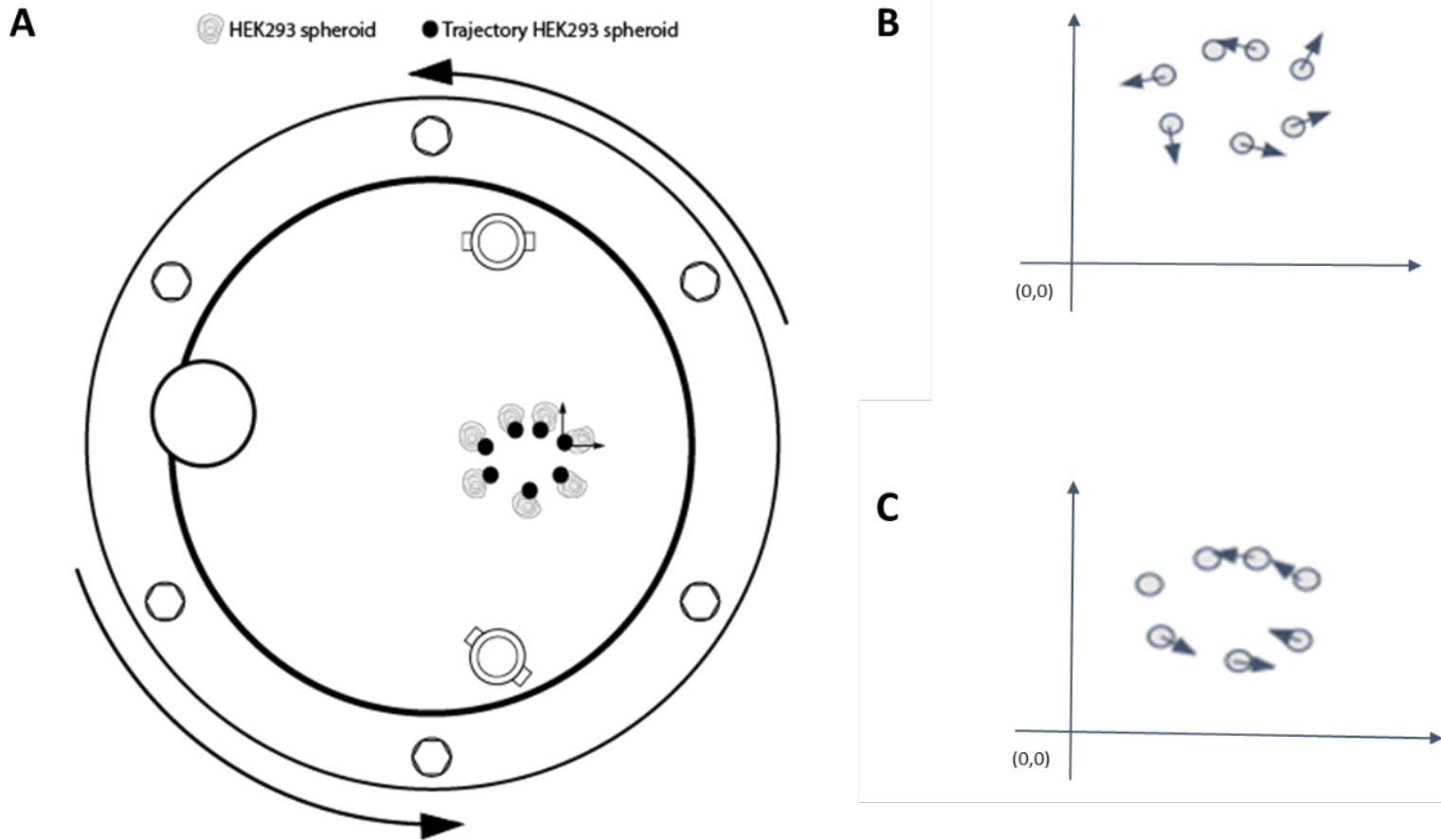


Figura 11. Determinación del porcentaje de gravedad de células HEK293 bajo CMS. A) Trazado de la trayectoria de las células HEK293 a partir del procesamiento digital de fotogramas a una velocidad de agitación de 25 rpm. B) Vector de velocidad del esferoide de células HEK293. El valor calculado para la velocidad fue $v = 0.0160 \pm 0.0257$ m/s. C) Vector de aceleración del esferoide celular HEK293. El valor calculado para la aceleración fue de 0.0366 ± 0.0204 m/s². La metodología aplicada permitió calcular el % de gravedad percibido por las células HEK293 en el sistema de cultivo HARV con un valor de $\%g = 0.0092 \pm 0.1175$ %.

9.2 Medición del parámetro de microgravedad

El procesado de las imágenes obtenidas a partir del registro de la trayectoria del esferoide de células HEK293 en medio DMEM F12 10% SFB a 25 rpm permitió calcular los parámetros del vector velocidad, el vector aceleración y la fracción de gravedad para 7 fotogramas que componen la trayectoria del esferoide en el sistema HARV. En la Figura 10, se observa que la trayectoria del esferoide tiende a ser circular, patrón que se repite durante cada ciclo.

La velocidad (V) del esferoide calculada fue de $0,0160 \pm 0,0257$ m/s (Tabla 6) con una aceleración (A) de 0.0366 ± 0.0204 m/s² (Tabla 7). Considerando la aceleración en el eje y los valores mínimo y máximo fueron $a_{(y \text{ minimum})} = -0.015$ m/s² y $a_{(y \text{ maximum})} = 0.0052$ m/s² (el signo menos indica dirección hacia abajo), el porcentaje de gravedad de esta aceleración vertical mínima y máxima percibida por las células HEK293 en el sistema de cultivo HARV fueron $[\%g]_{\text{minimum}} = 0.153\%$ (dirección hacia abajo) y $[\%g]_{\text{maximum}} = -0.053\%$ (donde el signo menos implica dirección contraria a la gravedad), ésta es la fracción de gravedad considerando $g = 9.81$ m/s². El efecto de la gravedad es mínimo en dirección descendente, compensado por el sistema rotacional (Figura 10).

Tabla 6. Componentes X, Y, magnitud y dirección del vector de velocidad.

Vx (m/s)	Vy (m/s)	V	V (°)
-0.010024122	-0.006682748	0.012047495	213.6900675
0.00390128	-0.014954906	0.015455394	-75.37912601
0.018205973	-0.00585192	0.019123348	-17.81888891
0.01365448	0.005201707	0.014611727	20.85445804
0.007152347	0.014954906	0.016577252	64.44003483
-0.01755576	0.005201707	0.018310173	163.4956386

Tabla 7. Componentes X, Y, magnitud y dirección del vector de aceleración.

Ax (m/s ²)	Ay (m/s ²)	A	A (°)
0.037636222	-0.014954906	0.040498573	-21.67060095
0.038661333	-0.00585192	0.039101709	-8.607161635
-0.012301333	0.005201707	0.013355918	157.0785811
-0.017573333	0.014954906	0.023075339	139.6022167
-0.066778666	0.005201707	0.066980952	175.5459542

Tabla 8. Porcentaje de gravedad presentado en cada cuadro para el esferoide.

Cuadro	Tiempo(s)	x coordenada (m)	y coordenada (m)	% Gravedad
1	0	0.12365757	0.05605489	
2	0.36	0.120048886	0.053649101	
3	0.73	0.121492359	0.048115786	0.152445529
4	1.1	0.128228569	0.045950575	0.059652598
5	1.47	0.133280727	0.047875207	-0.053024532
6	1.84	0.135927095	0.053408522	-0.152445529
7	2.21	0.129431464	0.055333154	-0.053024532

9.3 Caracterización de cultivos de células HEK293 en condiciones de microgravedad simulada (HARV, 25 rpm; CMS) y en condiciones de gravedad terrestre (cultivos en matraz agitado, 100 rpm: CGT)

Se comparó el crecimiento de cultivos de células HEK293 en medio Excell 293 sin suero bajo CMS a 25 rpm y CGT en matraces agitados a 100 rpm's y se muestra en la Figura 11A. La tasa de crecimiento específico para el CMS fue de 0.0221 h^{-1} con un tiempo de duplicación de 31 h, y la tasa de crecimiento específico fue de $0,0247 \text{ h}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de 28 h para el CGT. La viabilidad celular para los cultivos en CMS fue del $86\% \pm 4\%$ y para el CGT (matraz agitado) la viabilidad fue del $80\% \pm 2\%$ a las 144 h. Se observa que la condición de microgravedad no afecta al desarrollo del cultivo. Los valores calculados de tiempo de duplicación para ambas condiciones se encuentran dentro del rango reportado de 24 h a 56 h para la línea celular HEK293 en medio Excell 293 libre de suero en condiciones de gravedad terrestre (Lorenzo et al., 2019; Román et al., 2018). Los valores de tiempo de duplicación entre CMS (28 h) y CGT (31 h) no difieren significativamente por lo que se puede afirmar que la condición de funcionamiento a 25 rpm's del HARV no impacta negativamente en el crecimiento y viabilidad de las células HEK293 (Figura 11A. La elección de cultivos en agitación de células HEK293 en suspensión como control de gravedad del suelo se debe a que éstas son las condiciones de cultivo estándar para la producción de proteínas recombinantes (Chin et al., 2019). No es posible utilizar las mismas velocidades en condiciones terrestres y de microgravedad debido a que dichos valores no son comparables, y tampoco son óptimos para el desarrollo del cultivo. Las células cultivadas en matraces agitados necesitan una velocidad de 100 rpm como condición óptima para la aireación del cultivo y la transferencia de masa (Chahal et al., 2014; L'Abbé et al., 2018) mientras que las células en el biorreactor HARV necesitan una velocidad de operación de 25 rpm para generar la condición de microgravedad simulada, que se determinaron en el presente trabajo siguiendo los criterios establecidos por Nickerson para bacterias y partículas (Nickerson et al., 2003).

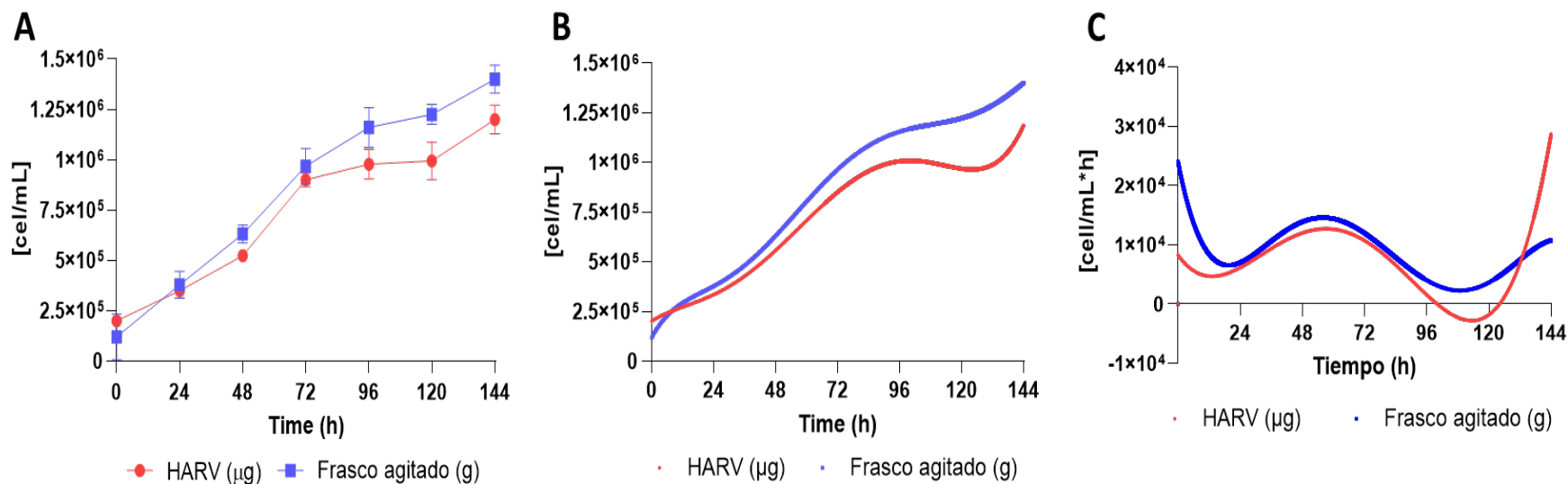


Figura 12. Crecimiento de cultivos celulares HEK293. A) Cinética de crecimiento de cultivos de células HEK293 en medio libre de suero bajo CMS y CGT. El tiempo de duplicación (dt) de los cultivos en μg fue de 31 h, frente a las 28 h del CGT en matraz agitado. B) Estimación del crecimiento de cultivos de células HEK293 utilizando una DNN a partir de datos experimentales. C) Estimación de las productividades de crecimiento celular para CMS y CGT calculadas a partir del enfoque DNN. Las productividades máximas de crecimiento celular se observan entre 48 y 72 h, tras lo cual se observa una disminución de la tasa de crecimiento en ambas condiciones.

La figura 11B muestra la identificación del proceso por la DNN, la integración de la estructura (4) y la ley de adaptación (3), permiten representar la ecuación diferencial estimada que gobierna el comportamiento de la variable $x_1(t)$ = concentración celular [célula/mL]. Para ambas condiciones experimentales, el error cuadrático de identificación (estimación DNN vs. datos experimentales) se determinó sobre el tiempo completo siendo inferior al 5% para ambos casos. Esto confirma la adaptación y la capacidad de la DNN para modelizar con precisión esta variable. Se obtuvieron resultados y calidad de aproximación equivalentes para el conjunto completo de variables del vector de estado en todas las condiciones experimentales. La Figura 11C muestra las productividades de crecimiento (célula/ml*h) para ambas condiciones calculadas mediante la aproximación DNN (2). Tanto el CMS como el CGT comienzan a aumentar su tasa de crecimiento a las 24 h, observándose un crecimiento máximo entre las 48 y 72 h y, a partir de ese momento, se produce una disminución de dicho valor. Después de 120 h, se observa un aumento de la productividad del crecimiento bajo CMS con respecto al CGT. Cabe destacar que no existen valores de referencia para cultivos celulares HEK293 en ambientes de microgravedad, por lo que se consideraron como referencia los valores reportados para CGT en medio libre de suero.

9.3 Morfología de cultivos de células HEK293 en condiciones de microgravedad simulada (HARV, 25 rpm; CMS) y en condiciones de gravedad terrestre (cultivos en matraz agitado, 100 rpm: CGT)

Los cambios morfológicos de los cultivos de células HEK293 en medio libre de suero Excell 293 a las 48 h, 96 h y 144 h se muestran en la Figura 12. Los cultivos de células HEK293 en medio libre de suero en CGT en cultivo estático utilizando matraces T se adhieren al sustrato, mostrando una morfología típica de un cultivo dependiente de anclaje: formación de una matriz extracelular y células de forma irregular y alargada (Freshney, 2010) (Figura 12A). Los cultivos en suspensión en matraz agitado bajo CGT se presentan en la Figura 12B. Como se observa, el cultivo tiende a formar agregados. Esta morfología ya se ha descrito en la descripción del proceso de adaptación de cultivos celulares HEK293 dependientes de anclaje a cultivos en suspensión (Figura 12B) (Malm et al., 2020). En CMS, las células presentan la morfología típica de un cultivo en suspensión homogéneo, y no se observan agregados celulares (Figura 12C).

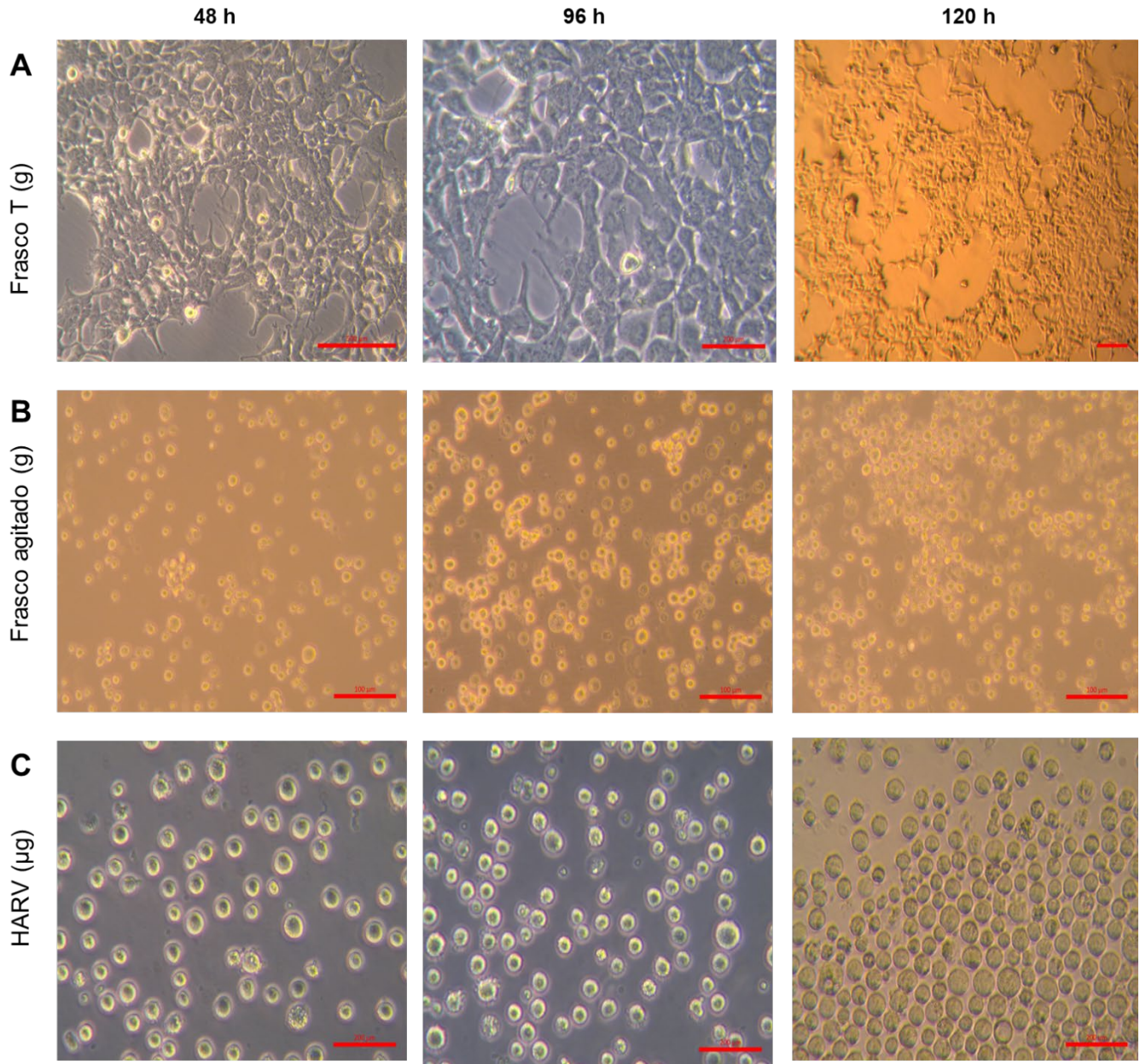


Figura 13. Figura 12. Morfología de los cultivos de células HEK293 a las 48 h, 96 h y 144 h. A) Cultivo estático de células HEK293 en medio libre de suero bajo CGT 20x. La barra de escala corresponde a 200 micras (rojo). B) Cultivo de células HEK293 en matraz agitado en medio libre de suero bajo CGT. La barra de escala corresponde a 100 micras (rojo). C) Cultivo de células HEK293 en medio libre de suero en biorreactor HARV bajo CMS. La barra de escala corresponde a 200 micras (rojo). Se observa un cambio morfológico evidente. El CMS en el biorreactor HARV de suero permite el desarrollo de cultivos en suspensión donde las células son esféricas sin formación de agregados. El CGT en cultivos estáticos favorece la adhesión celular mientras que en cultivos en matraces agitados se observa la formación de agregados celulares.

9.4 Producción de Ad5/INF- γ y de IFN gamma (INF- γ)

Para analizar la producción de vectores adenovirales y proteína recombinante, se infectaron cultivos de células HEK293 utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 5 y una densidad celular de 0.6×10^6 células/mL en medio libre de suero en CMS y CGT. Como se muestra en la Figura 13A, el título viral a las 72 h post-infección fue de 9.31×10^{11} PFU/mL y 9.17×10^9 PFU/mL respectivamente, lo que supone un incremento de 101,5 veces para CMS. Como se observó, los porcentajes de viabilidad celular fueron mayores en CMS que en el caso de CGT. La identificación mediante la estructura DNN aplicada a la producción de partículas adenovirales converge a los datos experimentales, con un error inferior al 5% a lo largo del tiempo de identificación. Se observa una mayor producción en el CMS (Figura 13B). El cálculo de las tasas de producción volumétrica a partir del modelo de la red neuronal diferencial (DNN) muestra que en las primeras 24 h la producción de partículas adenovirales comienza en el CMS, el cultivo en el HARV favoreció la producción alcanzando el valor máximo a las 84.8 h ($0,16$ UFP/mL*h), mientras que para el CGT se observa a las 99 h ($0,15$ UFP/mL*h). Ambas condiciones inician una desaceleración de la producción más tarde, a las 96 h (Figura 13C).

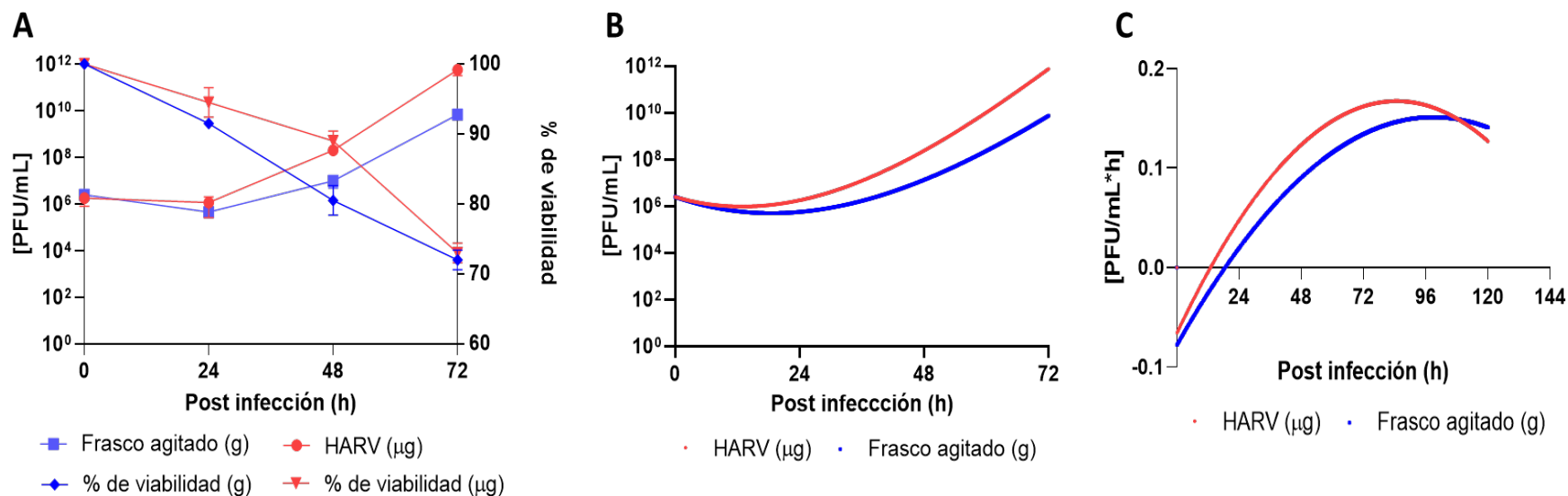


Figura 14. Producción de Ad5/inf-γ en células HEK293 bajo CMS. A) Título de partículas virales infecciosas determinado por dilución de punto final a las 72 h post-infección y % de viabilidad. B) Estimación del título viral mediante red neuronal diferencial (DNN) en cultivos de células HEK293 a partir de datos experimentales. C). Tasa de producción volumétrica de partículas adenovirales. La producción de partículas adenovirales comienza tras 24 h post-infección en ambas condiciones. El CMS favoreció la producción del vector viral mediante dos valores exponenciales que reflejan el valor en la tasa de producción volumétrica cuyo valor máximo se alcanzó a las 81,1 h en comparación con el valor del CGT de 96 h post-infección.

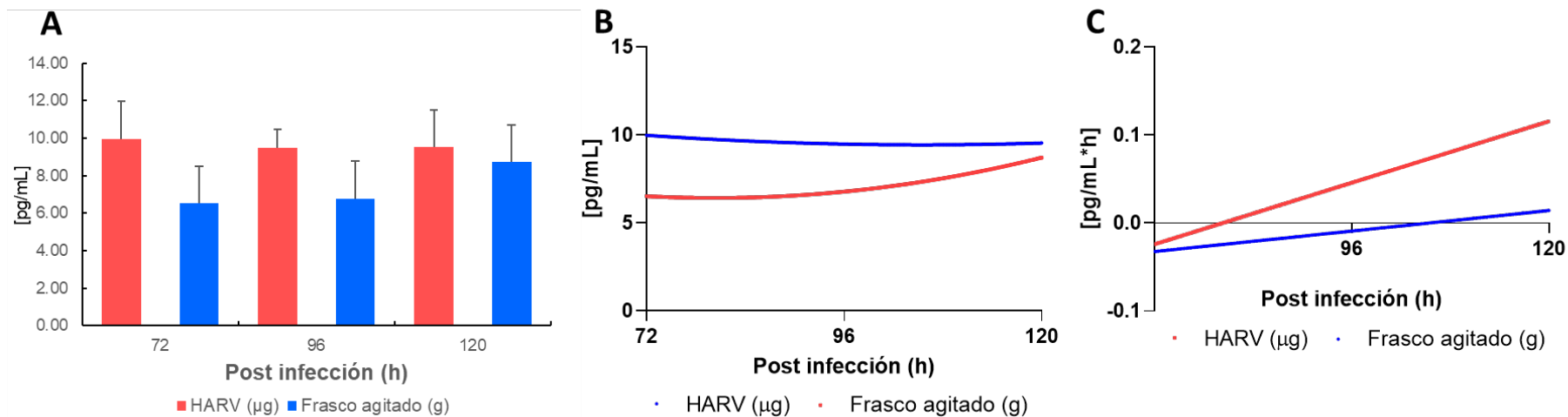


Figura 15. Producción de IFN gamma recombinante en células HEK293. A) Concentración de IFN gamma recombinante determinada a partir de los sobrenadantes a las 72, 96 y 120 h. B) Aproximación DNN de la concentración de IFN gamma recombinante con corresponder a la observada en los datos experimentales. C) Tasas de producción volumétrica de IFN gamma. Se observa que el CMS predice una mayor tasa de producción volumétrica en el CMS (hasta 0,11 pg/mL*h para el cultivo HARV a las 120 h post infección) en comparación con los valores del CGT (hasta 0,01 pg/mL*h para el matraz agitador). Como se ha observado, no se obtuvieron diferencias significativas de concentración entre ambas condiciones, pero existe una tendencia a aumentar la producción de proteína recombinante en el caso del CMS.

Además, se realizó la identificación y cuantificación del IFN gamma para demostrar si la producción de proteína recombinante también se veía afectada por la CMS. Las concentraciones de IFN gamma determinadas a partir de los sobrenadantes a las 72, 96 y 120 h se muestran en la Figura 14A. La concentración de IFN gamma fue de 9,53 pg/mL a las 120 h para el CMS, mientras que dicho valor fue de 8,72 pg/mL para el CGT; esto demuestra que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones. La baja expresión del transgén se atribuye al hecho de que el HEK293/Ad5 está dirigido principalmente a la producción del vector adenoviral. El enfoque DNN con respecto a la producción de IFN gamma se corresponde con los datos experimentales. Las tasas de producción volumétrica de IFN gamma mantienen un valor máximo a las 120 h (0,11 pg/mL*h) en CMS y (0,01 pg/ML*h) en CGT. Existe una mayor tendencia a aumentar el valor en el caso de CMS que en el caso de CGT (Figura 14C).

9.5 Consumo de nutrientes y producción de subproductos

La Tabla 9 muestra las tasas específicas de consumo de glucosa y glutamina, así como las tasas específicas de producción de lactato y glutamato de los cultivos de células HEK293 en CMS y CGT, que se calcularon en la fase exponencial de los cultivos. Tanto en CMS como en CGT, no existen diferencias drásticas en las tasas específicas de consumo de glucosa ($q_s\text{Glu}$) y glutamina ($q_s\text{Gln}$). Estas tasas de consumo de glucosa y glutamina concuerdan con otros valores reportados para células HEK293 en medio comercial libre de suero (Emma & Kamen, 2013). Las producciones de lactato y glutamato se encontraron entre los valores previamente reportados y sin diferencias significativas entre las dos condiciones. Sin embargo, en el caso de los cultivos infectados utilizando el vector viral Ad5/ γ -inf el consumo de glucosa disminuye en CMS (569.79 ± 28.20 pg/cel*h), observándose que la tasa de consumo específico de glucosa es 2 veces menor que en el caso de CGT (1111.11 ± 35.30 pg/cel*h), provocando un aumento de la captación de nutrientes por parte de las células. El consumo específico de glutamina es mayor en CMS que en CGT. Este resultado se refleja en la tasa específica de consumo de glutamina (4000.00 ± 70.77 pg/cel*h), mientras que en los cultivos CGT, la tasa

específica de consumo de glutamina es de 495.43 ± 56.50 pg/cel*h, es decir, unas 8 veces más. La tasa de formación de lactato (qpLac) muestra una diferencia siendo menor en CGT con un valor de 283.34 ± 40.40 pg/cel*h en comparación con la tasa de formación de lactato en CMS de 817.77 ± 89.80 pg/cel*h. Esto está relacionado con el hecho de que las células HEK293 presentan una co-metabolización de glucosa y lactato, donde el lactato es transportado al citosol y oxidado por las mitocondrias para generar piruvato dando lugar a un metabolismo celular más eficiente (Martínez-Monge et al., 2019). Este modelo metabólico no parece verse afectado por la CMS. Para las tasas de producción de glutamato (qpE) se observa una relación con el consumo de glutamina 95.01 ± 21.20 pg/cel*h para CMS y 39.82 ± 19.50 pg/cel*h lo que explica la diferencia observada entre CMS y CGT.

Tabla 9. Tasas específicas de consumo de nutrientes de glucosa y glutamina y tasas específicas de producción de lactato y glutamato bajo CMS y CGT de cultivos de células HEK293.

Cultivo	qsGlu (pg/cel*h)	qsGln(pg/cel*h)	qplac(pg/cel*h)	qpE(pg/cel*h)
HARV (CMS)	666.22 ± 28.20	239.11 ± 14.10	115.08 ± 14.50	23.32 ± 10.70
Frasco agitado (CGT)	536.19 ± 14.10	239.08 ± 21.2	142.43 ± 12.20	19.22 ± 8.30
HARV Ad5/inf-γ (CMS)	569.79 ± 28.20	4000.00 ± 70.77	817.77 ± 89.80	95.01 ± 21.20
Frasco agitado Ad5/inf-γ (GC)	1111.11 ± 35.30	495.43 ± 56.50	283.34 ± 40.40	39.82 ± 19.50

10. DISCUSION.

La generación de microgravedad simulada en condiciones terrestres ha sido un reto desde el diseño de diversos dispositivos en la década de 1950. Una de las preguntas que muchos investigadores se hacen es si dichos dispositivos garantizan la generación de tal condición por lo que un punto crítico de este proyecto era demostrar en primera instancia que el sistema de micro gravedad simulada utilizado, HARV era capaz de generar la condición de microgravedad de manera reproducible en los experimentos. Por ello, se realizó la caracterización de dicho sistema y los resultados demostraron que los porcentajes de gravedad verticales mínimo y máximo percibidos por las células HEK293 en el sistema de cultivo HARV fueron $[\%g]_{\text{minimum}} = 0.153\%$ (dirección descendente) y $[\%g]_{\text{maximum}} = -0.053\%$ (donde el signo menos implica dirección contraria a la gravedad), ésta es la fracción de gravedad considerando $g=9.81 \text{ m/s}^2$, dando un valor específico de $.015 \text{ m/s}^2$. El efecto de la gravedad es mínimo en dirección descendente compensando el sistema rotacional. La comparación entre los resultados obtenidos a partir de experimentos realizados en la gravedad inherente de la Tierra y los realizados en microgravedad "real" (ISS, vuelos espaciales tripulados y no tripulados) o microgravedad simulada (recipientes de paredes giratorias, clinostatos y máquinas rpm) permite observar la respuesta biológica de las células en un entorno de microgravedad. La magnitud notificada a la que pueden observarse los efectos de la microgravedad oscila entre 10^{-2} y 10^{-6} g (Brungs et al., 2016; Chao & Das, 2015; Nickerson et al., 2016a; Wuest et al., 2015). Cabe mencionar que el principio de operación del biorreactor HARV es la clinorrotación, una estrategia experimental para simular microgravedad en la Tierra. En la clinorrotación el cultivo celular se coloca en un dispositivo rotatorio que gira lentamente (HARV), lo que genera una fuerza que contrarresta parcialmente la gravedad terrestre. Si bien, la clinorrotación no logra eliminar completamente la gravedad, es una herramienta novedosa para simular condiciones de microgravedad, especialmente cuando no es posible establecer protocolos de cultivo celular en el espacio (Mansour et al., 2023). Los sistemas que generan microgravedad simulada por clinorrotación han utilizado para investigar cómo

la microgravedad afecta a diversos organismos y sistemas biológicos como se refiere en la Tabla 3.

Se observa que el cultivo de células HEK293 en medio Excell 293 sin suero bajo CMS a 25 rpm no impacta en el crecimiento ni en la viabilidad del cultivo con respecto a la CGT en matraces agitados a 100 rpm's. Los tiempos de duplicación calculados para la CMS fueron de 31 h y 28 h para la CGT, dicha diferencia de 3 h se atribuye a un proceso de adaptación de las células HEK293 a la condición de microgravedad simulada en el biorreactor HARV. La viabilidad celular para los cultivos en CMS fue del $86\% \pm 4\%$ y para el CGT la viabilidad fue del $80\% \pm 2\%$ a las 144 h, y se considera que este tiempo representa el final del cultivo donde los nutrientes como la glucosa han descendido considerablemente y aumentado la concentración de metabolitos como el lactato, lo cual es normal en el cultivo estándar de las células HEK293. Los cultivos de células animales en condiciones de microgravedad simulada pueden mostrar una disminución en su tasa de crecimiento, crecer más rápido o mantener tasas de crecimiento similares a las de la gravedad terrestre (Vashi et al., 2023). Se ha reportado que estas diferencias pueden deberse a la adaptación de las células a un entorno de microgravedad. A la fecha, no se tienen datos reportados de células HEK293 con relación a la caracterización del crecimiento en medios libres de suero o la producción de biofármacos en CMS. Los reportes de células HEK293 en CMS incluyen estudios relacionados con la respuesta celular a esta condición. Ryu y colaboradores concluyeron que la microgravedad simulada contribuye a la inducción de la autofagia mediante la regulación de AMPK en células HEK293 en clinostato 3D (Ryu et al., 2014). Se ha establecido la relación entre la apoptosis y la activación de los canales de potasio sensibles al calcio en cultivos de células HEK293 en condiciones de microgravedad simulada, con el propósito de desarrollar un modelo para el entendimiento de enfermedades cardiovasculares (Xie & Xie, 2014). Los resultados obtenidos en cuanto a crecimiento y viabilidad muestran que la CMS tiene amplias aplicaciones en la mejora del cultivo de células de mamífero, esta condición ayuda a obtener cultivos en suspensión homogéneos de una manera más fácil y rápida.

Los cambios morfológicos observados en CMS y CGT en medio libre de suero Excell293 evidencian como las células en microgravedad simulada se adoptan características de un cultivo en suspensión de manera más óptima que en condiciones estándar de cultivo en matraces agitados. Este fenómeno aún no está reportado para células HEK293 y podría ser una excelente herramienta para promover la generación de cultivos en suspensión homogéneos. Hasta ahora, una de las principales aplicaciones del sistema de cultivo celular rotatorio (RCCS) ha sido la provisión de condiciones para establecer cultivos celulares difíciles, como las células progenitoras, demostrando que la viabilidad y la morfología celular no se ven afectadas en tales condiciones (Kaya et al., 2017; Navran, 2008).

Por otra parte, la manera de entender los cambios biológicos de las células en el ambiente de microgravedad es por medio del fenómeno de la mecanotransducción. Éste explica los cambios que se producen en las células en entornos de microgravedad real y microgravedad simulada. Las células convierten los estímulos mecánicos en señales bioquímicas mediante la activación de cascadas de señalización. Se ha propuesto que la fuerza gravitatoria desempeña un papel crucial en la regulación de la homeostasis celular y tisular mediante la inducción de tensiones mecánicas experimentadas a nivel celular. Se ha informado de que los cambios morfológicos más evidentes de las células animales cultivadas en CMS son las alteraciones de la forma, el tamaño, el volumen y las propiedades de adhesión de las células (Buker et al., 2019; Corydon et al., 2016; Mann et al., 2019). Estos cambios morfológicos se traducen en alteraciones en la transcripción, transducción y organización del citoesqueleto celular, principalmente asociado a microtúbulos y filamentos de actina. (Bradbury et al., 2020).

Con respecto a la producción de Ad5/INF- γ y de la proteína modelo IFN gamma (INF- γ), se observa que el sistema transitorio HEK293-Adenovirus es más eficiente produciendo las partículas virales que el INF- γ . El título viral a las 72 h post-infección fue de 9.31×10^{11} PFU/mL para la CMS y 9.17×10^9 PFU/mL para la CGT, lo que supone un incremento de 101.5 veces para CMS. La concentración de IFN gamma determinada

alas 120 h fue de 9,53 pg/mL para el CMS, mientras que para la CGT EL valor fue de 8.72 pg/mL para el CGT, no observando una diferencia significativa entre ambos valores. Aunque no se dispone de datos específicos en otros reportes sobre la producción de adenovirus bajo CMS, se ha informado de que en algunos casos las condiciones de microgravedad favorecen la infectividad y el ensamblaje de la cápside del virus de Epstein-Barr, norovirus humana, virus de la hepatitis E y citomegalovirus humano (Brinley et al., 2013; Radtke y Herbst-Kralovetz, 2012). Estas observaciones son consistentes con los resultados presentados en este trabajo y apoyan la aseveración de que el CMS más el uso de un medio químicamente definido promueve una condición favorable para producir partículas infectivas de vectores adenovirales. Con respecto a la producción de proteínas recombinantes en CMS la información es limitada, lo reportado no incluye células de mamífero. En 2015 Huangfu y colaboradores reportaron que la microgravedad simulada tuvo un impacto positivo en las productividades de las enzimas reporteras PGUS expresadas en *Pichia pastoris* recombinante, con aumentos de aproximadamente 2.46 veces en los rendimientos específicos de PGUS (Huangfu et al., 2015). En 2012 se reportó un aumento de la expresión de aminooxidasa sensible a la semicarbazida en *E. coli BL21* en condiciones de microgravedad simulada, en comparación con la gravedad normal (Y. Zhang et al., 2012). Otro factor a considerar es la cristalización de proteínas, ácidos nucleicos, nucleosomas, subunidades ribosómicas o virus, en un entorno de microgravedad real y simulada que se ha descrito puede dar como resultado cristales con defectos menores en comparación con los cristales formados bajo la gravedad normal de la Tierra, teniendo como resultado un cambio positivo en la función biológica (McPherson & Delucas, 2015).

Hablando de la eficiencia del cultivo en condiciones de microgravedad, Las tasas específicas de consumo de glucosa y glutamina, así como las tasas específicas de producción de lactato y glutamato en los cultivos de células HEK293 en CMS y CGT, no muestran diferencias significativas que sugieran que la CMS tenga un impacto en el metabolismo celular. Estas tasas de consumo de glucosa y glutamina son consistentes

con valores previamente reportados para células HEK293 en medio comercial libre de suero, según lo descrito por Kamen 2013 (Emma & Kamen, 2013). Dado que no existen datos bibliográficos disponibles sobre cultivos de células HEK293 en medio libre de suero bajo condiciones de microgravedad real o simulada, se utilizaron los valores de gravedad normales reportados como referencia. Sin embargo, en el caso de los cultivos infectados utilizando el vector viral Ad5/INF- γ el consumo de glucosa disminuye en CMS 2 veces en comparación con la condición a CGT, provocando un aumento de la captación de nutrientes por parte de las células más eficiente. El consumo específico de glutamina es mayor en CMS, 8 veces más con respecto a CGT. La tasa de formación de lactato (q_{pLac}) muestra una diferencia siendo menor en CGT. Esto está relacionado con el hecho de que las células HEK293 presentan una co-metabolización de glucosa y lactato, donde el lactato es transportado al citosol y oxidado por las mitocondrias para generar piruvato dando lugar a un metabolismo celular más eficiente (Martínez-Monge et al., 2019). Como se menciona anteriormente, los cambios observados en el consumo y producción de metabolitos son más evidentes en los cultivos infectados en CMS. Se ha descrito el efecto de la microgravedad real y la microgravedad simulada sobre el metabolismo celular, que incluye aumento en el metabolismo de los carbohidratos, cambio en el rango del consumo del rango del sustrato de carbono y cambio en el metabolismo de los aminoácidos que se traduce en un mayor estrés oxidativo. Es importante mencionar que la respuesta a la microgravedad no es universal, ya que distintos tipos de células tienen distintas repuestas al mismo tipo de stress (Iwase et al., 2020; Najrana & Sanchez-Esteban, 2016; Sharma & Curtis, 2022).

Ahora bien, para conocer el comportamiento de los cultivos, los procesos complejos como el bioproceso HARV se modelan matemáticamente tradicionalmente basándose en balances de materia y relaciones cinéticas; este enfoque crece rápidamente en supuestos que deben considerarse para mantener el número de parámetros implicados en las ecuaciones en un número acotado. Una vez derivado el modelo, cada parámetro propuesto debe ser calculado; esto implica un conjunto

extra de experimentos adicionales para validarlos, situación que en condiciones prácticas no es factible debido al consumo de tiempo y al constante cambio en las condiciones reales, especialmente el control y optimización del proceso, en este proyecto la condición de microgravedad es un factor adicional para considerar (Sutskever et al., 2013). Esta situación se evita mediante la estrategia de adaptación de redes neuronales diferenciales. En este estudio se ha implementado un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias artificiales como estrategia para modelar (identificación dinámica) el comportamiento del cultivo por lotes de células animales; con esto se generó un modelo que puede ser utilizado en aplicaciones de control; Éste es el primer resultado y la base para proponer un futuro esquema de optimización, aunque esto implicará cambios en el esquema experimental, estableciendo una entrada de control, es decir un modo de operación alimentado por lotes o continuo. La estrategia de modelado basada en redes neuronales diferenciales ha demostrado que puede aproximar eficientemente las variables involucradas en el proceso, convirtiéndose así en una alternativa para obtener una representación de un proceso complejo, como el implementado, para implementaciones prácticas.

En este trabajo se presenta únicamente la identificación (modelado) del sistema batch sin integrar una estrategia de control, lo que implicaría que un esquema fed-batch o un esquema de cultivo continuo con una entrada de control. Sin embargo, una vez que se dispone del esquema de identificación basado en redes neuronales diferenciales, se dispone de una estructura artificial para proponer un controlador. Una opción para este tipo de procesos es el control modelo-predictivo, donde el modelo del sistema compromete las ecuaciones diferenciales de la red neuronal diferencial. Esta estrategia permite predecir la respuesta en un horizonte temporal definido para resolver el control óptimo a partir del estado actual del sistema dado por el modelo de la red neuronal diferencial.

11. CONCLUSIÓN

En conclusión, el presente trabajo muestra resultados consistentes con la hipótesis planteada. La condición de microgravedad simulada no impacta en el crecimiento y la viabilidad de células HEK293 en medio libre de suero, sin embargo, supone un incremento de 101.5 veces el título viral de Ad5/INF- γ con respecto a la CGT. Con respecto al consumo de metabolitos y generación de productos los cambios más notables fueron en los cultivos infectados con Ad5/INF- γ donde el consumo de glucosa en CMS es 2 veces menor que en CGT, la Glutamina se consume 8 veces más en CMS, y de acuerdo con el título viral obtenido se concluye un impacto positivo en el aprovechamiento de los sustratos en CMS. El enfoque de red neuronal diferencial aplicado permite generar un modelo no paramétrico describe en tiempo continuo los datos experimentales del cultivo de células HEK293 en CMS frente a los datos de cultivos en CGT.

Así, el presente trabajo se erige como pionero en el campo de la producción de biofármacos en condiciones de microgravedad simulada. La falta de información previa en esta área resalta la relevancia de los resultados encontrados en este trabajo y su potencial impacto en la industria de la biotecnología. Los resultados también indican que la CMS tiene un amplio espectro de aplicaciones en la mejora del cultivo de células de mamífero, como la obtención de cultivos en suspensión homogéneos de manera más eficiente y rápida. La aplicación de protocolos que incluyan la CMS abre nuevas perspectivas para la producción eficiente de biofármacos, lo que puede tener un impacto significativo en la industria de la salud y la medicina.

12. PERSPECTIVAS

- Caracterizar la producción de INF gamma en un sistema de expresión estable (células HEK293/INFgamma, células CHO/INF gamma en condición de microgravedad simulada, para establecer si esta condición favorece la producción de INF- γ .
- Profundizar en la ventaja que ofrece el sistema de microgravedad simulada para adaptar cultivos adherentes a cultivos en suspensión en linajes celulares que han sido difíciles de adaptar en suspensión como las células MDCK en la producción de vacunas de uso veterinario.
- Profundizar en el establecimiento de modelos de cultivos tridimensionales en condiciones de microgravedad simulada, para establecer modelos de estudio relacionados con enfermedades como el cáncer.
- Realizar la Proteómica de cultivos en condición de microgravedad simulada vs microgravedad terrestre, para identificar la expresión a la alta y a la baja de genes implicados en la producción de proteínas recombinantes.

11. REFERENCIAS

1. Antonakoudis, A., Strain, B., Barbosa, R., Jimenez del Val, I., & Kontoravdi, C. (2021). Synergising stoichiometric modelling with artificial neural networks to predict antibody glycosylation patterns in Chinese hamster ovary cells. *Computers & Chemical Engineering*, 154, 107471. <https://doi.org/10.1016/J.COMPCHEMENG.2021.107471>
2. Arnberg, N. (2012). Adenovirus receptors: Implications for targeting of viral vectors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(8), 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.005>
3. Barrila, J., Radtke, A. L., Crabbé, A., Sarker, S. F., Herbst-Kralovetz, M. M., Ott, C. M., & Nickerson, C. A. (2010). Organotypic 3D cell culture models: Using the rotating wall vessel to study host–pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 8(11), 791–801. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2423>
4. Berg, J., & Nyström, K. (2018). A unified deep artificial neural network approach to partial differential equations in complex geometries. *Neurocomputing*, 317, 28–41. <https://doi.org/10.1016/J.NEUCOM.2018.06.056>
5. Billiau, A., & Matthys, P. (2009). Interferon- γ : A historical perspective. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(2), 97–113. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.02.004>
6. Bradbury, P., Wu, H., Choi, J. U., Rowan, A. E., Zhang, H., Poole, K., Lauko, J., & Chou, J. (2020a). Modeling the Impact of Microgravity at the Cellular Level: Implications for Human Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(February), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00096>
7. Bradbury, P., Wu, H., Choi, J. U., Rowan, A. E., Zhang, H., Poole, K., Lauko, J., & Chou, J. (2020b). Modeling the Impact of Microgravity at the Cellular Level: Implications for Human Disease. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00096>
8. Briegleb, W. (1992). Some qualitative and quantitative aspects of the fast-rotating clinostat as a research tool. *ASGSB Bulletin : Publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*.
9. Briend, E., Ferguson, G. J., Mori, M., Damera, G., Stephenson, K., Karp, N. A., Sethi, S., Ward, C. K., Sleeman, M. A., Erjefält, J. S., & Finch, D. K. (2017). IL-18 associated with lung lymphoid aggregates drives IFN γ production in severe COPD. *Respiratory Research*, 18(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0641-7>
10. Brungs, S., Egli, M., Wuest, S. L., Peter, P. C., Jack, J. J., Ngo Anh, T. J., & Hemmersbach, R. (2016). Facilities for Simulation of Microgravity in the ESA Ground-Based Facility Programme. *Microgravity Science and Technology*, 28(3), 191–203. <https://doi.org/10.1007/s12217-015-9471-8>
11. Brungs, S., Egli, Marcel, Wuest, S. L., M. Christianen, P. C., W. A. van Loon, J. J., Ngo Anh, T. J., Hemmersbach, R., Brungs, S., Egli, M., Wuest, S. L., M. Christianen, P. C., W. A. van Loon, J. J., Ngo Anh, T. J., & Hemmersbach, R. (2016). Facilities for Simulation of Microgravity in the ESA Ground-Based Facility Programme.

- MicST, 28(3), 191–203. <https://doi.org/10.1007/S12217-015-9471-8>
12. Buken, C., Sahana, J., Corydon, T. J., Melnik, D., Bauer, J., Wehland, M., Krüger, M., Balk, S., Abuagela, N., Infanger, M., & Grimm, D. (2019). Morphological and Molecular Changes in Juvenile Normal Human Fibroblasts Exposed to Simulated Microgravity. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-48378-9>
 13. Caccuri, F., Ronca, R., Laimbacher, A. S., Berenzi, A., Steimberg, N., Campilongo, F., Mazzuca, P., Giacomini, A., Mazzoleni, G., Benetti, A., Caselli, E., Presta, M., Di Luca, D., Fraefel, C., & Caruso, A. (2017). U94 of human herpesvirus 6 down-modulates Src, promotes a partial mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits tumor cell growth, invasion and metastasis. *Oncotarget*, 8(27), 44533–44549. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17817>
 14. Chahal, P. S., Schulze, E., Tran, R., Montes, J., & Kamen, A. A. (2014). Production of adeno-associated virus (AAV) serotypes by transient transfection of HEK293 cell suspension cultures for gene delivery. *Journal of Virological Methods*, 196, 163–173. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2013.10.038>
 15. Chen, G.-X., Zhang, S., He, X.-H., Liu, S.-Y., Ma, C., & Zou, X.-P. (2014). Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives. *OncoTargets and Therapy*, 7, 1901–1909. <https://doi.org/10.2147/OTT.S50483>
 16. Chin, C. L., Goh, J. B., Srinivasan, H., Liu, K. I., Gowher, A., Shanmugam, R., Lim, H. L., Choo, M., Tang, W. Q., Tan, A. H. M., Nguyen-Khuong, T., Tan, M. H., & Ng, S. K. (2019). A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53391-z>
 17. Clejan, S., O'Connor, K., & Rosensweig, N. (2001). Tri-dimensional prostate cell cultures in simulated microgravity and induced changes in lipid second messengers and signal transduction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00138.x>
 18. Costa, E., Fernandes, J., Ribeiro, S., Sereno, J., Garrido, P., Rocha-Pereira, P., Coimbra, S., Catarino, C., Belo, L., Bronze-da-Rocha, E., Vala, H., Alves, R., Reis, F., & Santos-Silva, A. (2014). Aging is Associated with Impaired Renal Function, INF-gamma Induced Inflammation and with Alterations in Iron Regulatory Proteins Gene Expression. *Aging and Disease*, 5(6), 356–365. <https://doi.org/10.14366/AD.2014.0500356>
 19. Cowger, N. L., Benes, E., Allen, P. L., & Hammond, T. G. (2017). Expression of renal cell protein markers is dependent on initial mechanical culture conditions. *Journal of Applied Physiology*, 92(2), 691–700. <https://doi.org/10.1152/jappl.2002.92.2.691>
 20. DeFelice, D. (2015). *What is Microgravity?* <http://www.nasa.gov/centers/glenn/shuttlestation/station/microgex.html>
 21. Dumont, J., Ewart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
 22. Feger, B. J., Thompson, J. W., Dubois, L. G., Kommaddi, R. P., Foster, M. W., Mishra,

- R., Shenoy, S. K., Shibata, Y., Kidane, Y. H., Moseley, M. A., Carnell, L. S., & Bowles, D. E. (2016). Microgravity induces proteomics changes involved in endoplasmic reticulum stress and mitochondrial protection. *Scientific Reports*, 6(June), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep34091>
23. Fernandes, C. S. M., Gonçcalves, B., Sousa, M., Martins, D. L., Barroso, T., Pina, A. S., Peixoto, C., Aguiar-Ricardo, A., & Roque, A. C. A. (2015). Biobased monoliths for adenovirus purification. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(12), 6605–6612. <https://doi.org/10.1021/am508907b>
 24. Ferranti, F., Bianco, M. Del, & Pacelli, C. (2020). Advantages and Limitations of Current Microgravity Platforms for Space Biology Research. *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 68, 11(1), 68. <https://doi.org/10.3390/APP11010068>
 25. Fischer, J., Schoppmann, K., Knie, M., & Laforsch, C. (2016). Responses of Microcrustaceans to Simulated Microgravity (2D-Clinorotation) - Preliminary Assessments for the Development of Bioregenerative Life Support Systems (BLSS). *Microgravity Science and Technology*, 28(3), 337–344. <https://doi.org/10.1007/s12217-015-9470-9>
 26. Gao, Z., Wu, T., Xu, J., Liu, G., Xie, Y., Zhang, C., Wang, J., & Wang, S. (2015). Generation of bioartificial salivary gland using whole-organ decellularized bioscaffold. *Cells Tissues Organs*. <https://doi.org/10.1159/000371873>
 27. Gardner, J. K., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2016). Three-dimensional rotating wall vessel-derived cell culture models for studying virus-host interactions. *Viruses*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/v8110304>
 28. Gautier, F., Sitepu, E., Le Blay, C., Kersey, G., & Sánchez, J. P. (2020). Drop Your Thesis! 2018 results: 4.74 seconds of microgravity conditions to enable future cubesat landings on asteroids. *Acta Astronautica*, 176, 139–155. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2020.06.003>
 29. Gradilla-Hernández, M. S., García-González, A., Gschaedler, A., Herrera-López, E. J., González-Avila, M., García-Gamboa, R., Montes, C. Y., & Fuentes-Aguilar, R. Q. (2020). Applying Differential Neural Networks to Characterize Microbial Interactions in an Ex Vivo Gastrointestinal Gut Simulator. *Processes* 2020, Vol. 8, Page 593, 8(5), 593. <https://doi.org/10.3390/PR8050593>
 30. Grimm, D., Schulz, H., Krüger, M., Cortés-sánchez, J. L., Egli, M., Kraus, A., Sahana, J., Corydon, T. J., Hemmersbach, R., Wise, P. M., Infanger, M., & Wehland, M. (2022). *La lucha contra el cáncer mediante la microgravedad: El esferoide multicelular como modelo de metástasis*.
 31. Grimm, D., Schulz, H., Krüger, M., Cortés-Sánchez, J. L., Egli, M., Kraus, A., Sahana, J., Corydon, T. J., Hemmersbach, R., Wise, P. M., Infanger, M., & Wehland, M. (2022). The Fight against Cancer by Microgravity: The Multicellular Spheroid as a Metastasis Model. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/ijms23063073>
 32. Grimm, D., Wehland, M., Pietsch, J., Aleshcheva, G., Wise, P., Loon, J. Van, Ulbrich, C., Magnusson, N. E., Infanger, M., & Bauer, J. (2014). Growing Tissues in Real and Simulated Microgravity: New Methods for Tissue Engineering. *TISSUE ENGINEERING*, 20(6). <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0704>

33. Gupta, M. M., Jin, L. (Electrical engineer), & Homma, N. (2003). *Static and dynamic neural networks: from fundamentals to advanced theory*. 722. https://books.google.com/books/about/Static_and_Dynamic_Neural_Networks.html?id=cRyepjPy7bcC
34. Haber, H., & Gerathewohl, S. J. (1951). Physics and psychophysics of weightlessness. *The Journal of Aviation Medicine*, 22(3), 180–189. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14850413>
35. Hammond, T., Allen, P. L., Gunter, M. A., Chiang, J., Giaever, G., Nislow, C., & Birdsall, H. H. (2018). Physical Forces Modulate Oxidative Status and Stress Defense Meditated Metabolic Adaptation of Yeast Colonies: Spaceflight and Microgravity Simulations. *Microgravity Science and Technology*, 30(3), 195–208. <https://doi.org/10.1007/S12217-017-9588-Z>
36. Hammond, T. G., & Hammond, J. M. (2001). Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 281(1), F12–F25.
37. Hammond, T. G., & Hammond, J. M. (2017). Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 281(1), F12–F25. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.1.f12>
38. Hatzistergos, K. E., Jiang, Z., Valasaki, K., Takeuchi, L. M., Balkan, W., Atluri, P., Saur, D., Seidler, B., Tsinoremas, N., DiFede, D. L., & Hare, J. M. (2018). Simulated Microgravity Impairs Cardiac Autonomic Neurogenesis from Neural Crest Cells. *Stem Cells and Development*, 27(12), 819–830. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0265>
39. Higginson, E. E., Galen, J. E., Levine, M. M., & Tennant, S. M. (2016). Microgravity as a biological tool to examine host–pathogen interactions and to guide development of therapeutics and preventatives that target pathogenic bacteria. *Pathogens and Disease*, 74(8), ftw095. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw095>
40. Hoson, T., Kamisaka, S., Masuda, Y., Yamashita, M., & Buchen, B. (1997). Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta*, 203(S1), S187–S197. <https://doi.org/10.1007/pl00008108>
41. Huang, B., Li, D. G., Huang, Y., & Liu, C. T. (2018a). Effects of spaceflight and simulated microgravity on microbial growth and secondary metabolism. *Military Medical Research*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40779-018-0162-9>
42. Huang, B., Li, D. G., Huang, Y., & Liu, C. T. (2018b). Effects of spaceflight and simulated microgravity on microbial growth and secondary metabolism. *Military Medical Research*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40779-018-0162-9>
43. Huangfu, J., Qi, F., Liu, H., Zou, H., Ahmed, M. S., & Li, C. (2015). Novel helper factors influencing recombinant protein production in *Pichia pastoris* based on proteomic analysis under simulated microgravity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2), 653–665. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6175-8>
44. Ishizuka, S., Kimura, Y., Sakon, I., Kimura, H., Yamazaki, T., Takeuchi, S., & Inatomi, Y. (2018). Sounding-rocket microgravity experiments on alumina dust. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06359-y>

45. Iwase, S., Nishimura, N., Tanaka, K., & Mano, T. (2020). Effects of Microgravity on Human Physiology. In *Beyond LEO - Human Health Issues for Deep Space Exploration [Working Title]* (Vol. 3, Issue 2, pp. 117–120). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90700>
46. Jansen, K. A., Donato, D. M., Balcioglu, H. E., Schmidt, T., Danen, E. H. J., & Koenderink, G. H. (2015). A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(11), 3043–3052. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2015.05.007>
47. Joosten, C. E., & Shuler, M. L. (2003). Effect of culture conditions on the degree of sialylation of a recombinant glycoprotein expressed in insect cells. *Biotechnology Progress*, 19(3), 739–749. <https://doi.org/10.1021/bp0201049>
48. Kim, T. J. (2021). Mechanobiology: A New Frontier in Biology. *Biology 2021*, Vol. 10, Page 570, 10(7), 570. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10070570>
49. Kiss, J. Z., Wolverton, C., Wyatt, S. E., Hasenstein, K. H., & van Loon, J. J. W. A. (2019). Comparison of Microgravity Analogs to Spaceflight in Studies of Plant Growth and Development. *Frontiers in Plant Science*, 10(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01577>
50. Kopp, S., Slumstrup, L., Corydon, T. J., Sahana, J., Aleshcheva, G., Islam, T., Magnusson, N. E., Wehland, M., Bauer, J., Infanger, M., & Grimm, D. (2016). Identifications of novel mechanisms in breast cancer cells involving duct-like multicellular spheroid formation after exposure to the Random Positioning Machine. *Scientific Reports*, 6(May), 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep26887>
51. L'Abbé, D., Bisson, L., Gervais, C., Grazzini, E., & Durocher, Y. (2018). Transient Gene Expression in Suspension HEK293-EBNA1 Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1850, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8730-6_1
52. Lamb, L. E. (1964). AN ASSESSMENT OF THE CIRCULATORY PROBLEM OF WEIGHTLESSNESS IN PROLONGED SPACE FLIGHT. *Aerospace Medicine*, 35, 413–419. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14170921>
53. Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., ... He, T.-C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*, 4(2), 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
54. Li, H., Dai, Y., Shu, J., Yu, R., Guo, Y., & Chen, J. (2015). Spheroid cultures promote the stemness of corneal stromal cells. *Tissue and Cell*, 47(1), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2014.10.008>
55. Lorenzo, E., Méndez, L., Rodríguez, E., Gonzalez, N., Cabrera, G., Pérez, C., Pimentel, R., Sordo, Y., Molto, M. P., Sardina, T., Rodríguez-Mallon, A., & Estrada, M. P. (2019). Plasticity of the HEK-293 cells, related to the culture media, as platform to produce a subunit vaccine against classical swine fever virus. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0864-8>
56. Lykens, J. E., Terrell, C. E., Zoller, E. E., Divanovic, S., Trompette, A., Karp, C. L., Aliberti, J., Flick, M. J., & Jordan, M. B. (2010). Mice with a Selective Impairment

- of IFN- Signaling in Macrophage Lineage Cells Demonstrate the Critical Role of IFN- Activated Macrophages for the Control of Protozoan Parasitic Infections In Vivo. *The Journal of Immunology*, 184(2), 877–885. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902346>
57. Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., Varley, P. G., Hatton, D., Grassi, L., Svensson, T., Nielsen, J., & Rockberg, J. (2020). Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Scientific Reports*, 10(1), 18996. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76137-8>
 58. Manley, P., & Lelkes, P. I. (2006). A novel real-time system to monitor cell aggregation and trajectories in rotating wall vessel bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 125(3), 416–424. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.030>
 59. Marrero, B., Messina, J. L., & Heller, R. (2009). Generation of a tumor spheroid in a microgravity environment as a 3D model of melanoma. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 45(9), 523–534. <https://doi.org/10.1007/s11626-009-9217-2>
 60. Mauldin, I. S., Wages, N. A., Stowman, A. M., Wang, E., Smolkin, M. E., Olson, W. C., Deacon, D. H., Smith, K. T., Galeassi, N. V., Chianese-Bullock, K. A., Dengel, L. T., Marincola, F. M., Petroni, G. R., Mullins, D. W., & Slingluff, C. L. (2016). Intratumoral interferon-gamma increases chemokine production but fails to increase T cell infiltration of human melanoma metastases. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(10), 1189–1199. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1881-y>
 61. McLaren, J. E., & Ramji, D. P. (2009). Interferon gamma: A master regulator of atherosclerosis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(2), 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.11.003>
 62. McNeill, E. P., Reese, R. W., Tondon, A., Clough, B. H., Pan, S., Froese, J., Palmer, D., Krause, U., Loeb, D. M., Kaunas, R., & Gregory, C. A. (2018). Three-dimensional in vitro modeling of malignant bone disease recapitulates experimentally accessible mechanisms of osteoinhibition. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1203-8>
 63. McPherson, A., & Delucas, L. J. (2015). Microgravity protein crystallization. *Npj Microgravity*, 1(July), 1–20. <https://doi.org/10.1038/npjmgrav.2015.10>
 64. Meenakshi, P., Ramya, S., Lavanya, J., Vijayalakshmi, V., & Sumanlatha, G. (2016). Effect of IFN- γ , IL-12 and IL-10 cytokine production and mRNA expression in tuberculosis patients with diabetes mellitus and their household contacts. *Cytokine*, 81, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.03.009>
 65. Melnik, D., Krüger, M., Kopp, S., Wehland, M., Bauer, J., Infanger, M., & Grimm, D. (2019). Microgravity-based Modulation of VEGF Expression in Human Thyroid Carcinoma Cells. *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/conf.fphys.2018.26.00002>
 66. Mendez, K. M., Broadhurst, D. I., & Reinke, S. N. (2019). The application of artificial neural networks in metabolomics: a historical perspective. *Metabolomics*, 15(11). <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1608-0>
 67. Microgravity, S., Masiello, T., Dhall, A., Hemachandra, M., Tokranova, N.,

- Melendez, J. A., & Castracane, J. (2018). *Analyzing Fluid Shear Stress in the RCCS : Applications for 3D Cell Culture in Analyzing Fluid Shear Stress in the RCCS : Applications for 3D Cell Culture in Simulated Microgravity*. November, 1–21.
68. Morbidelli, L., Monici, M., Marziliano, N., Cogoli, A., Fusi, F., Waltenberger, J., & Ziche, M. (2005). *Simulated hypogravity impairs the angiogenic response of endothelium by up-regulating apoptotic signals*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.124>
69. Moreno-Villanueva, M., Feiveson, A. H., Krieger, S., Brinda, A. M. K., Von Scheven, G., Bürkle, A., Crucian, B., & Wu, H. (2018). Synergistic effects of weightlessness, isoproterenol, and radiation on DNA damage response and cytokine production in immune cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113689>
70. Najrana, T., & Sanchez-Esteban, J. (2016). Mechanotransduction as an adaptation to gravity. In *Frontiers in Pediatrics* (Vol. 4, Issue DEC). Front Pediatr. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00140>
71. Navran, S. (2008). The application of low shear modeled microgravity to 3-D cell biology and tissue engineering. *Biotechnology Annual Review*, 14(08), 275–296. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(08\)00011-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(08)00011-2)
72. Nickerson, C. A., Ott, C. M., Wilson, J. W., Ramamurthy, R., LeBlanc, C. L., Höner zu Bentrup, K., Hammond, T., & Pierson, D. L. (2003). Low-shear modeled microgravity: A global environmental regulatory signal affecting bacterial gene expression, physiology, and pathogenesis. *Journal of Microbiological Methods*, 54(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00018-6)
73. Nickerson, C. A., Pellis, N. R., & Ott, C. M. (2016a). Effect of spaceflight and spaceflight analogue culture on human and microbial cells: Novel insights into disease mechanisms. *Effect of Spaceflight and Spaceflight Analogue Culture on Human and Microbial Cells: Novel Insights into Disease Mechanisms*, 1–301. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3277-1>
74. Nickerson, C. A., Pellis, N. R., & Ott, C. M. (2016b). Effect of spaceflight and spaceflight analogue culture on human and microbial cells: Novel insights into disease mechanisms. *Effect of Spaceflight and Spaceflight Analogue Culture on Human and Microbial Cells: Novel Insights into Disease Mechanisms*, 1–301. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3277-1>
75. Obeid, D., & Bauvois, B. (2006). *Interferons : Mechanisms , Biological Activities and Survey of their Use in Human Diseases*. 431–444.
76. Pereira, P., Forn-Cuni, G., Figueras, A., & Novoa, B. (2016). Pathogen-dependent role of turbot (*Scophthalmus maximus*) interferon-gamma. *Fish and Shellfish Immunology*, 59, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.021>
77. Peters, R. T., Low, S. C., Kamphaus, G. D., Dumont, J. A., Amari, J. V., Lu, Q., Zarbis-Papastoitis, G., Reidy, T. J., Merricks, E. P., Nichols, T. C., & Bitonti, A. J. (2010). Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein. *Blood*, 115(10). <http://www.bloodjournal.org/content/115/10/2057?sso-checked=true>
78. Pietsch, J., Sickmann, A., Weber, G., Bauer, J., Egli, M., Wildgruber, R., Infanger, M., & Grimm, D. (2011). A proteomic approach to analysing spheroid formation

- of two human thyroid cell lines cultured on a random positioning machine. *PROTEOMICS*, 11(10), 2095–2104. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000817>
79. Pletser, V., & Pletser, V. (2020). Aircraft Parabolic Flights: A Gateway to Orbital Microgravity and Extra-Terrestrial Planetary Gravities. *Preparation of Space Experiments*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.93464>
 80. Pletser, V., Rouquette, S., Friedrich, U., Clervoy, J. F., Gharib, T., Gai, F., & Mora, C. (2015). European parabolic flight campaigns with Airbus ZERO-G: Looking back at the A300 and looking forward to the A310. *Advances in Space Research*, 56(5), 1003–1013. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2015.05.022>
 81. Pollard, E. C. (1965). Theoretical studies on living systems in the absence of mechanical stress. *Journal of Theoretical Biology*, 8(1), 113–123. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(65\)90097-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(65)90097-4)
 82. Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *Psychological Bulletin*, 6(1), 27–28. <https://doi.org/10.1037/h0063767>
 83. Ranieri, V. M., Thompson, B. T., Barie, P. S., Dhainaut, J.-F., Douglas, I. S., Finfer, S., Gårdlund, B., Marshall, J. C., Rhodes, A., Artigas, A., Payen, D., Tenhunen, J., Al-Khalidi, H. R., Thompson, V., Janes, J., Macias, W. L., Vangerow, B., & Williams, M. D. (2012). Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *New England Journal of Medicine*, 366(22), 2055–2064. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202290>
 84. Reddy, V. S., & Nemerow, G. R. (2014). Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), 11715–11720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408462111>
 85. Reynolds, S. R. (1961). Sensory deprivation, weightlessness and anti-gravity mechanisms. The problem of fetal adaptation to a floating existence. *Aerospace Medicine*, 32, 1061–1067. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14491726>
 86. Rodriguez-Vita, J., & Lawrence, T. (2010). The resolution of inflammation and cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21(1), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.006>
 87. Román, R., Farràs, M., Camps, M., Martínez-Monge, I., Comas, P., Martínez-Espelt, M., Lecina, M., Casablanco, A., & Cairó, J. J. (2018). Effect of continuous feeding of CO₂ and pH in cell concentration and product titers in hIFN γ producing HEK293 cells: Induced metabolic shift for concomitant consumption of glucose and lactate. *Journal of Biotechnology*, 287(October), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.10.005>
 88. Rungarunlert, S., Ferreira, J. N., & Dinnyes, A. (2016). Novel Bioreactor Platform for Scalable Cardiomyogenic Differentiation from Pluripotent Stem Cell-Derived Embryoid Bodies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1502, 169–179. https://doi.org/10.1007/7651_2016_341
 89. Sharma, G., & Curtis, P. D. (2022). The Impacts of Microgravity on Bacterial Metabolism. *Life*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/life12060774>
 90. Shinde, V., Brungs, S., Hescheler, Jürgen, Hemmersbach, R., Sachinidis, A., &

- Sachinidis asachinidis, A. (2016). Pipette-based Method to Study Embryoid Body Formation Derived from Mouse and Human Pluripotent Stem Cells Partially Recapitulating Early Embryonic Development Under Simulated Microgravity Conditions. *Microgravity Science and Technology*, 28, 287–295. <https://doi.org/10.1007/s12217-015-9469-2>
91. Sisakyan, N. M., Gazenko, O. G., & Antipov, V. V. (1965). Satellite biological experiments--major results and problems. *Life Sciences and Space Research*, 3, 185–205. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12035801>
 92. Srinivasan, G., Morgan, D., Varun, D., Brookhouser, N., & Brafman, D. A. (2018). An integrated biomanufacturing platform for the large-scale expansion and neuronal differentiation of human pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells. *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.008>
 93. Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>
 94. Sutskever, I., Martens, J., Dahl, G., & Hinton, G. (2013). momentum, Nesterov accelerate, On the importance of initialization and momentum in deep learning. *Journal of Machine Learning Research (JMLR)*, 28(2010), 1139–1147.
 95. SYNTHICON, I. (2019). STEM CELL CULTURE SYSTEMS RCCS-4SC. http://synthecon.com/pages/stem_cell_culture_system_rccs-4sc_synthecon_36.asp
 96. Tackett, N., Bradley, J. H., Moore, E. K., Baker, S. H., Minter, S. L., DiGiacinto, B., Arnold, J. P., & Gregg, R. K. (2019). Prolonged exposure to simulated microgravity diminishes dendritic cell immunogenicity. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50311-z>
 97. Thiel, C. S., Tauber, S., Lauber, B., Polzer, J., Seebacher, C., Uhl, R., Neelam, S., Zhang, Y., Levine, H., & Ullrich, O. (2019). Rapid Morphological and Cytoskeletal Response to Microgravity in Human Primary Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences 2019*, Vol. 20, Page 2402, 20(10), 2402. <https://doi.org/10.3390/IJMS20102402>
 98. Tixador, R., Richoille, G., Gasset, G., Templier, J., Bes, J. C., Moatti, N., & Lapchine, L. (1985). Study of minimal inhibitory concentration of antibiotics on bacteria cultivated in vitro in space (Cytos 2 experiment). *Aviation Space and Environmental Medicine*, 56(8), 748–751.
 99. Trotter, B., Otte, K. A., Schoppmann, K., Hemmersbach, R., Fröhlich, T., Arnold, G. J., & Laforsch, C. (2015). The influence of simulated microgravity on the proteome of *Daphnia magna*. *Npj Microgravity*, 1. <https://doi.org/10.1038/npjmgrav.2015.16>
 100. Ughachukwu, P., Okonkwo, P., Unekwe, P., & Ogama, J. (2016). Effect of methylprednisolone injection on interleukin-4 and interferon-gamma expression following hepatitis B vaccination in mice. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(5), 1540–1545. <https://doi.org/10.3906/sag-1504-33>
 101. van Boxel-Dezaire, A. H. H., & Stark, G. R. (2007). Cell type-specific signaling

- in response to interferon-gamma. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 316, 119–154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17969446>
102. Vashi, A., Sreejith, K. R., & Nguyen, N. T. (2023). Lab-on-a-Chip Technologies for Microgravity Simulation and Space Applications. *Micromachines*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/mi14010116>
 103. Vidyasekar, P., Shyamsunder, P., Arun, R., Santhakumar, R., Kapadia, N. K., Kumar, R., Verma, R. S., Grimm, D., Wehland, M., Pietsch, J., Aleshcheva, G., Wise, P., Loon, J. Van, Ulbrich, C., Magnusson, N. E., Infanger, M., Bauer, J., Camirand, A., Goltzman, D., ... Richard Mains, Sharon Reynolds, Tacey Baker, K. S. (2017). Cellular biology. *PLoS ONE*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/bit>
 104. Von Beckh, H. J. (1954). Experiments with animals and human subjects under sub and zero-gravity conditions during the dive and parabolic flight. *The Journal of Aviation Medicine*, 25(3), 235–241.
 105. Wang, H., Li, X., Krause, L., Görög, M., Schüler, O., Hauslage, J., Hemmersbach, R., Kircher, S., Lasok, H., Haser, T., Rapp, K., Schmidt, J., Yu, X., Pasternak, T., Aubry-Hivet, D., Tietz, O., Dovzhenko, A., Palme, K., & Ditengou, F. A. (2016). 2-D Clinostat for Simulated Microgravity Experiments with Arabidopsis Seedlings. *Microgravity Science and Technology*, 28(1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s12217-015-9478-1>
 106. Wang, S., Zhang, N., Di, J., Zhao, W., Shi, G., Xie, R., Hu, B., & Yang, H. (2021). Analysis of the effects of magnetic levitation to simulate microgravity environment on the Arp2/3 complex pathway in macrophage. *Journal of Biological Physics*, 47(3), 323–335. <https://doi.org/10.1007/S10867-021-09581-W/METRICS>
 107. Warnke, E., Kopp, S., Wehland, M., Hemmersbach, R., Bauer, J., Pietsch, J., Infanger, M., & Grimm, D. (2016). Thyroid Cells Exposed to Simulated Microgravity Conditions – Comparison of the Fast Rotating Clinostat and the Random Positioning Machine. *Microgravity Science and Technology*, 28(3), 247–260. <https://doi.org/10.1007/s12217-015-9456-7>
 108. Wehland, G. A. · J. B. · R. H. · M. E. · M. (2016). Tissue Engineering of Cartilage on Ground-Based Facilities. *Microgravity Science and Technology*, 28(3), 237–245. <https://doi.org/10.1007/s12217-015-9479-0>
 109. Wong, W. C., Li, J., & Wang, X. (2018). *Recurrent Neural Network-based Model Predictive Control for Continuous Pharmaceutical Manufacturing*. <http://arxiv.org/abs/1807.09556>
 110. Xiang, K., Ying, G., Yan, Z., Shanshan, Y., Lei, Z., Hongjun, L., & Maosheng, S. (2015). Progress on adenovirus-vectored universal influenza vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 11(5), 1209–1222. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1016674>
 111. Xie, Y., & Xie, Z. (2014). Treatment of Diabetic Cardiomyopathy through Upregulating Autophagy by Stimulating AMP-Activated Protein Kinase. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* (Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405530-8.00007-8>
 112. Yamaguchi, K., Itoh, K., Ohnishi, N., Itoh, Y., Baum, C., Tsuji, T., Nagao, T.,

- Higashitsuji, H., Okanoue, T., & Fujita, J. (2003). Engineered long terminal repeats of retroviral vectors enhance transgene expression in hepatocytes in vitro and in vivo. *Molecular Therapy*, 8(5), 796–803. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2003.08.005>
113. Zafar, A., Lee, J., Yesmin, S., Paget, M. B., Bailey, C. J., Murray, H. E., & Downing, R. (2019). Rotational culture and integration with amniotic stem cells reduce porcine islet immunoreactivity in vitro and slow xeno-rejection in a murine model of islet transplantation. *Xenotransplantation*. <https://doi.org/10.1111/xen.12508>
114. Zhang, S., Wu, Y., Weng, Y., Xu, Z., Chen, W., Zheng, D., Lin, W., Liu, J., & Zhou, Y. (2017). In Vitro Growth of Mouse Preantral Follicles Under Simulated Microgravity Video Link. *J. Vis. Exp.*, 1303791556(5564110), 1–9. <https://doi.org/10.3791/55641>
115. Zhang, Y., Lai, C., Duan, J., Guan, N., Ullah, K., & Deng, Y. (2012). Simulated microgravity affects semicarbazide-sensitive amine oxidase expression in recombinant *Escherichia coli* by HPLC-ESI-MS/MS analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(3), 809–816. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3652-1>
116. Zheng, Y., Ji, S., Wu, H., Tian, S., Wang, X., Luo, P., Fang, H., Wang, Z., Wang, J., Wang, Z., Xiao, S., & Xia, Z. (2015). Acceleration of diabetic wound healing by a cryopreserved living dermal substitute created by micronized amnion seeded with fibroblasts. *American Journal of Translational Research*, 7(12), 2683–2693. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26885266>

12. ANEXOS

12.1 Artículo para titulación.

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2023, Article ID 8836756, 11 pages
<https://doi.org/10.1155/2023/8836756>



Research Article

Characterization and Analysis of HEK293/Adenovirus Type 5 Cell Cultures under Simulated Microgravity Using Differential Neural Network Modeling

Carlos A. Tavira-Montalvan ¹, Alejandro Garcia-Gonzalez ²,
and Angélica Meneses-Acosta ¹

¹Laboratorio 7 de Biotecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62209, Mexico

²Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Av. General Ramon Corona 2514, Nuevo México, Zapopan, Jalisco, Mexico C.P. 45138

Correspondence should be addressed to Angélica Meneses-Acosta; angelica_meneses@uaem.mx

Received 23 December 2022; Revised 17 July 2023; Accepted 24 July 2023; Published 14 August 2023

Academic Editor: Syed Hassan

Copyright © 2023 Carlos A. Tavira-Montalvan et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

HEK293 cells are the common system to produce adenoviral vectors for vectorized vaccines and gene therapy products. Therefore, the improvement of this type of cell culture is highly relevant nowadays. Furthermore, the high aspect ratio vessel (HARV) bioreactor provides a simulated microgravity condition (SMGC) which allows the establishment of *in vitro* models of mammalian cells. The present work is aimed at showing the characterization of HEK293 cell cultures in serum-free medium under SMGC and to identify a set of adaptable time differential equations from experimental data through a nonparametric mathematical modeling using differential neural networks (DNN). Results showed that the HARV bioreactor enables to obtain a gravity percentage equal to $[\%g]_{\text{maximum}} = -0.053\%$ (where minus sign implies against the gravity direction). In addition, the characterization of HEK293 culture under SMGC revealed that such condition favored the production of infective viral particles as well as the uptake of basic nutrients such as glucose and glutamine, but the cell concentration was not significantly affected. As shown, these results contribute to improve the adenoviral vector production, and the DNN analysis is useful to model the kinetic changes and to build the foundations for control strategies and optimization of adenoviral production in further studies.

1. Introduction

Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells are the common system for adenovirus production. This type of cells has been used since 1977 [1] due to the fact that they were cloned with the E1 region of Ad5, so they allow the propagation of nonreplicative adenoviruses and other types of viral vectors [2]. These cells originally were grown as adherent cells, but nowadays, there are different clones that grow in suspension cultures, and their use has been increased for the production of biopharmaceuticals and gene therapy vectors [3]. In addition, adenoviral vectors as gene delivery systems have interesting characteristics such as relative easy manipulation, high

production titers (up to 10^{12} VP/mL), high tropism of infection, episomal genome into the host cell, and high immunogenicity [4]. Currently, the HEK293/adenovirus system is a key element in the production novel vaccines against various infectious agents such as SARS-CoV-2 [5–7].

In another hand, during the early 1980s, the National Aeronautics and Space Administration (NASA) started to develop bioprocesses using mammalian cell culture in space and studying the microgravity environment (10^{-2} to 10^{-6} g). Some advantages demonstrated by such environment were that the absence of gravity-driven convection reduced the hydrodynamic shear stress and decrease of hydrostatic pressure as well as a significant decrease on cell sedimentation [8,

9]. To create microgravity conditions, NASA developed the patented rotating wall vessel (RWV) bioreactor by Syntheon Inc., which is a rotary cell culture system (RCCS) that simulates microgravity. The high aspect ratio vessel (HARV) is one of the RCCS designs. HARV is a device that allows establishing an experimental setup where there is not a consistent gravitational field. HARV design allows the establishment of *in vitro* models of mammalian cells. Furthermore, it can be applied in the implementation of organotypic cultures, host-pathogen interaction models, evaluation of new therapeutic targets, toxicology, and evaluation of new drugs [10–12]. Microgravity devices have allowed the establishment of cultures for cell therapy protocols focused on optimizing stem cell cultures [13] and understanding and identifying therapeutic targets for diseases such as cancer [14] and the generation of three-dimensional cultures on the development of new drugs in tissue engineering [15].

In addition, mathematical modeling and validation of coupled cell motion, nutrient transport, and cell culture kinetics are still a challenge for rotating and nonrotating bioreactors used for mammalian cell culture [16]. In this regard, the dynamic system identification approach is a reliable alternative to build a mathematical model from observed input-output datasets [17]. System identification theory deals with the problem of extracting governing equations from experimental data because it considers that data are abundant whereas models often remain elusive [18]. The identification procedure is characterized by three main components: the dataset, the set of candidate models, and the estimation method [19]. Particularly, differential neural networks (DNN) have been successfully implemented for nonparametric identification of highly nonlinear bioprocess. In this context, this work presents the effect of SMGC on the production of adenoviral vectors using HEK293 cells, as well as the implementation of DNN for the nonparametric identification of this process and an input-output modeling created by this set of adaptive differential equations, which model the kinetic changes and allow to propose new control strategies to optimize the adenoviral vector production in further studies. So, the characterization described in this work is of great importance in order to improve the knowledge of biopharmaceutical-producing cultures.

2. Methodology

2.1. HEK293 Cells. Human embryonic kidney cell line (HEK293) was obtained from the ATCC (ATCC catalog no. CRL-1573). Initially, HEK293 cells were cultured in DMEM F12 (Gibco, catalog no. 12500062) and 10% FBS (ByProducts Batch No. FBS19003, catalog no. 90020), and then, such cells were adapted to Excell 293 serum-free medium (Sigma, catalog no. 14571C) and supplemented with 4 mM of glutamine (Sigma, catalog no. G8540). Cells were incubated at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity in an Eppendorf® New Brunswick™ S411 incubator.

2.2. Type 5 Adenoviral Vector/Gamma Interferon (*Ad5/γ-inf*) Stock. Nonreplicative adenoviral vector type 5 that expresses gamma interferon (*Ad5/γ-inf*) was generated in the Labora-

tory 7 of Faculty of Pharmacy at the Autonomous University of the State of Morelos, Mexico [20]. Briefly, the Adeno-X™ Expression System1 kit (Clontech cat. no. PT3414-1) was used for the molecular construction of *Ad5/γ-inf* gamma. Amplification was done by 6 consecutive passages reaching a viral titer stock of 3.6×10^{11} PFU/mL. The viral titer was determined by the endpoint dilution method [21].

2.3. The Rotary Cell Culture System- (RCCS-) HARV. The microgravity condition was simulated in a rotating cell culture system (RCCS-1), type high aspect ratio autoclavable vessel (HARV) (Houston, Texas 77054, USA). Such a device has a diameter of 99.06 mm, a depth of 6.33 mm, and a total volume of 50 mL. The extra volume of culture medium (approximately 10 mL) was used to remove air from the system which is removed with the syringes from the filling ports. The rotation speed for HEK293 cell cultures was finally determined as 25 rpm (as shown in the results). Operation of the HARV system was done inside of an incubator (Thermo Fisher Model Series 3 water jacketed) at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity in a BSL2 laboratory.

2.4. Assessment of Microgravity Conditions in the Experimental Setup. Microgravity conditions during the experiments were evaluated by an image processing approach. Trajectories of HEK293 cell spheroids inside the bioreactor were recorded to estimate the resultant gravity component during rotation. An embedded CCD video camera (POXXXJS2-3, 13 megapixels) of a cellular phone (Huawei P smart) was implemented to register the spheroid's trajectories. The camera and the bioreactor were positioned inside the biosafety cabinet, 30 cm apart and perpendicular to the image plane. Experiments were recorded, and videos were saved in mp4 format to be processed offline. The schematic representation of trajectories is shown in Figure 1. Later, videos were decomposed into frames (jpg format), according to the camera's time resolution to an interval of one-third of a second (1/3 s) between them. A 9.96 cm radius was chosen in order to establish the pixel/cm ratio. Open-source software Kinovea 0.8.15 and ImageJ 1.53 were used to perform this process. In each frame, the trajectory of this point through each cycle was registered with a pair of coordinates on the image labeled as $C_i(x(n), y(n))$, where C_i corresponds to the geometric center of the i th spheroid and $x(n), y(n)$ correspond to the coordinates on each n th frame in meters. The coordinates of a complete trajectory during one revolution were used to determine the average linear velocity $v(n)$ and acceleration $a(n)$ at each frame. These variables are given by the following functions depending on x coordinates and on time, where $t(n)$ and $t(n-1)$ correspond to the time registered during the n and the previous $(n-1)$ frame: $v_x = x(n) - x(n-1)/t(n) - t(n-1)$, and $a_x = v_x(n) - v_x(n-1)/t(n) - t(n-1)$. Analogous expressions were used for the determination of components $v_y(n)$ and $a_y(n)$. The magnitude and direction of $v(n)$ and $a(n)$ were calculated and depicted in their vectorial representation over the image plane. To estimate the fraction of gravity acceleration over each spheroid at each n frame, the following calculation was performed: gravity fraction $(n) = (a_y(n) * 100)/-g$, where $g = 9.81 \text{ m/s}^2$.

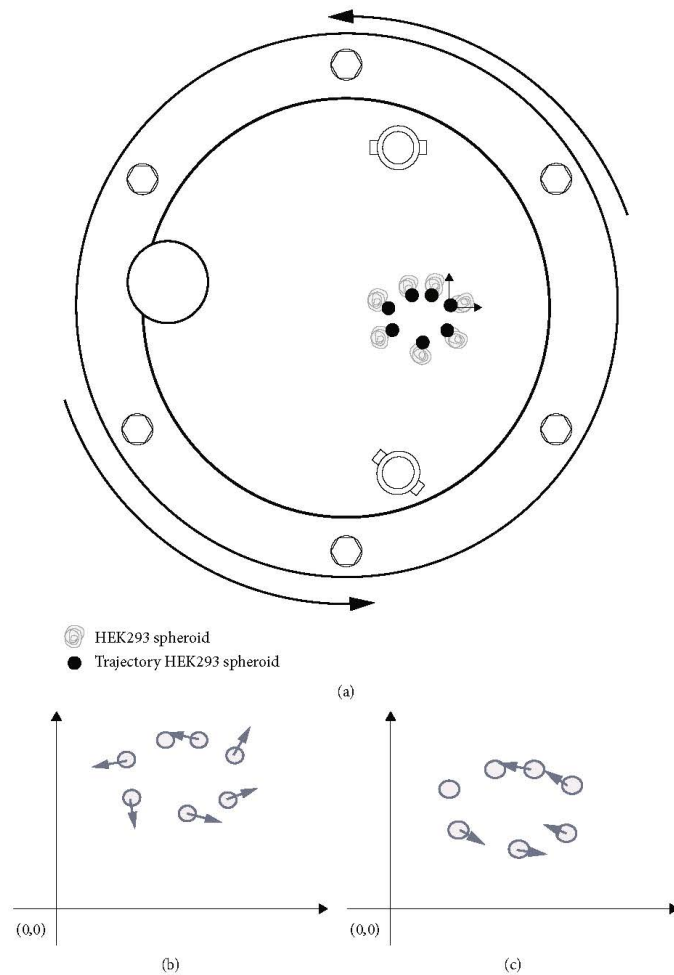


FIGURE 1: Determination of HEK293 cell gravity percentage under SMGC. (a) Trajectory plot of HEK293 cells taken from digital processing of photographs at an agitation speed of 25 rpm. (b) Representation of velocity vector of the HEK293 cell spheroid. The calculated average value for velocity vector magnitude was $|v| = \sqrt{v_x^2 + v_y^2} = 0.016 \text{ m/s}$ S.D. 0.0026 m/s. (c) Representation of acceleration vector of the HEK293 cell spheroid. The calculated average value for the acceleration vector magnitude was $|a| = \sqrt{a_x^2 + a_y^2} = 0.0366 \text{ m/s}^2$ S.D. 0.0204 m/s^2 . Considering acceleration on y-axis, minimum and maximum values were $a_{y \text{ minimum}} = -0.015 \text{ m/s}^2$ and $a_{y \text{ maximum}} = 0.0052 \text{ m/s}^2$ (minus sign indicates downward direction); the percentage of gravity of this minimum and maximum vertical acceleration perceived by the HEK293 cells in the HARV culture system were $\%g_{\text{minimum}} = 0.153\%$ (downward direction) and $\%g_{\text{maximum}} = -0.053\%$ (where minus sign implies against the gravity direction); this is the fraction of gravity considering $g = 9.81 \text{ m/s}^2$. The effect of gravity is minimum in the downward direction, compensated for the rotational system.

2.5. HEK293 Cell Culture Characterization under Simulated Microgravity Conditions (HARV; SMGC) and under Earth's Gravity Conditions (Shake Flask Cultures: EGC). HEK293 cell culture growth kinetics were established in SMGC using 50 mL of Excell 293 serum-free medium with an inoculum of

2×10^5 cells/mL and maintained at 37°C and 5% CO₂; HARV rotation speed was 25 rpm in all the experiments. These cell cultures were compared to the ones of HEK293 in EGC using 250 mL shaken flasks (using 50 mL of culture medium) at 100 rpm into an orbital shaker incubator

(Eppendorf® New Brunswick™ S41i) with a volume of 50 mL of Excell 293 serum-free medium with an initial inoculum of 2×10^5 cells/mL at 37°C and 5% CO₂.

2.5.1. Cell Counting and Viability. The amount of total and viable cells per mL was determined by the trypan blue (Gibco, catalog no. 15250061) exclusion technique [22].

2.5.2. Nutrient Measurement. Glucose, glutamine, lactate, and glutamate were measured on a YSI biochemical analyzer (YSI model 2900).

2.6. Ad5 γ -inf Infection Kinetics. HEK293 cell cultures at SMGC and EGC were infected by the recombinant vector Ad5 γ -inf using a multiplicity of infection (MOI) of 5 and a cell density of 0.6×10^6 cell/mL; such conditions were previously established by Sosa-García [23]. γ -Interferon (γ -inf) expression and adenovirus titers were sampled at 72 h, 96 h, and 120 h. Supernatants were stored at -20°C and dry pellets at -80°C for subsequent analysis using protease inhibitor. γ -inf expression was measured by the ELISA platinum kit (Invitrogen BMS228). Adenovirus titer was determined by the Reed and Muench method [21].

2.7. Nonparametric Dynamic Identification by Differential Neural Networks

2.7.1. Identification Assumptions and Experimental Dataset. For the nonparametric identification of the process, the cell culture system in a batch operating condition (no input flow) was represented by the general class of continuous nonlinear systems, set out by the following set of ordinary differential equations:

$$\frac{dx(t)}{dt} = f(x(t)) + \xi(t), \quad (1)$$

where $x(t) \in R^n$ is the state vector at time $t \geq t_0$, with a given initial condition $x(t_0)$. In the particular case of kinetic of growth, $x(t) \in R^5$ for noninfected experiments, and $x(t) \in R^7$ for the infected experiment, with the following components: $x_1(t)$ is the cell concentration (cell/mL), $x_2(t)$ is the viral production (PFU/mL), and $x_3(t)$ is the interferon production, at current time t . The $\xi(t) \in R^n$ is an additive bounded vector of deterministic noise affecting the state vector which considers the possible experimental noise. Experimental values of each variable in state vector $x(t) \in R^n$ were registered offline and preprocessed by simple fitting polynomial regression to build a continuous time-series dataset. This dataset is used to estimate the dynamic model given by adaptive differential equations as it is described below.

2.7.2. Differential Neural Network Modeling Structure. The following approach was based on the methodology presented in Gradilla-Hernández et al. [24]. A differential neural network (DNN) is an adaptive nonlinear differential equation used to approximate the right-hand side $f(x(t))$ of the system (1); such approximation depends on the time-varying parameters (weights, $W(t)$) which must be

adjusted by a concrete learning law. This set of differential equations involves two parts: a linear section represented by a Hurwitz matrix $A \in R^{n \times n}$ with constant components and an adaptable nonlinear section with time-variable sigmoid functions multipliers $\sigma(x(t))$ (vector of activation functions); this is

$$\frac{d\hat{x}(t)}{dt} = A\hat{x}(t) + W(t)\sigma(\hat{x}(t)), \quad (2)$$

where $\hat{x} \in R^n$ is the estimated state vector by the DNN, $A \in R^{n \times n}$, $W \in R^{n \times p}$, and $\sigma(\cdot) \in R^{p \times 1}$. The constant parameters as well as the time-varying parameters should be properly adjusted to guarantee a correct state approximation between $x(t)$ and $\hat{x}(t)$. Matrix $W(t)$ provides the adaptive capacity of the DNN and is given by the solution of the following set of differential equations:

$$\begin{aligned} \frac{dW(t)}{dt} &= -(2k)^{-1}P\Omega(\hat{x}(t), \hat{x}(t-h(t))\sigma^T(\hat{x}(t)) + (2k)^{-1}P\hat{W}(t), \\ \Omega(\hat{x}(t), \hat{x}(t-h(t))) &= 2\delta(t-h(t)) + \hat{W}(t)\sigma(\hat{x}(t)), \end{aligned} \quad (3)$$

where $\delta := \hat{x}(t) - x(t)$ is the identification error, $\hat{W}(t) = W(t) - \hat{W}$ for a given \hat{W} , $k > 0$ is the adaptation rate, and P is a matrix with the following characteristics: $P \in R^{n \times n}$, $P = P^T$.

The set of parameters for the DNN identifier for noninfected experiments ($x(t) \in R^5$) is selected as linear stable matrix $A = -0.03 \times I^{5 \times 5}$, the adaptable weight matrix as a diagonal array $W_1(t) = [w_{11}(t) \ 0 \ 0 \ 0 \ 0; \ 0 \ w_{22}(t) \ 0 \ 0 \ 0; \ 0 \ 0 \ w_{33}(t) \ 0 \ 0; \ 0 \ 0 \ 0 \ w_{44}(t) \ 0; \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ w_{55}(t)]$, and the vector of sigmoid functions $\sigma(\hat{x}(t)) = [\sigma_1(\hat{x}_1(t)) \ \sigma_2(\hat{x}_2(t)) \ \sigma_3(\hat{x}_3(t)) \ \sigma_4(\hat{x}_4(t)) \ \sigma_5(\hat{x}_5(t))]$; then, the particular nonparametric identification structure (dynamic model) is given by

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} \frac{d\hat{x}_1(t)}{dt} \\ \frac{d\hat{x}_2(t)}{dt} \\ \frac{d\hat{x}_3(t)}{dt} \\ \frac{d\hat{x}_4(t)}{dt} \\ \frac{d\hat{x}_5(t)}{dt} \end{bmatrix} &= \begin{bmatrix} -0.03 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -0.03 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -0.03 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -0.03 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -0.03 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{x}_1(t) \\ \hat{x}_2(t) \\ \hat{x}_3(t) \\ \hat{x}_4(t) \\ \hat{x}_5(t) \end{bmatrix} \\ &+ \begin{bmatrix} w_{11}(t) & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & w_{22}(t) & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & w_{33}(t) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & w_{44}(t) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & w_{55}(t) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sigma_1(\hat{x}_1(t)) \\ \sigma_2(\hat{x}_2(t)) \\ \sigma_3(\hat{x}_3(t)) \\ \sigma_4(\hat{x}_4(t)) \\ \sigma_5(\hat{x}_5(t)) \end{bmatrix}. \end{aligned} \quad (4)$$

This structure is also extended for the infected experiments case to proper dimensions ($x(t) \in R^7$). The given

model after the adjustment of (4) is a set of ordinary differential equation representing the rate of change for every variable considered in the process. It is important to remark that this approach is not a static regression analysis over the time, but a dynamic and adaptable model at any t .

2.8. Statistics. Experiments were performed by triplicate ($n = 3$), and the mean was calculated. Percentage gravity was calculated from frames of three independent experiments (3 cultures in the HARV bioreactor). The error bars represent the standard deviation for each condition. Each variable is approximated by simple polynomial regression to create a continuous time series of data, and a correlation coefficient criterion of greater than 0.95 was set. The structure of the polynomial function is not considered in the analysis and is used exclusively as a continuous data generator.

3. Results and Discussion

3.1. Assessment of the Microgravity Experimental Condition.

The processing of obtained images from the recording of the spheroid trajectory of HEK293 cells in DMEM F12 10% SFB medium at 25 rpm allowed the calculation of velocity vector parameters, the acceleration vector, and the gravity fraction for 7 frames that make up the spheroid trajectory in the HARV system. In Figure 1, it is observed that the spheroid trajectory tends to be circular, a pattern that is repeated during each cycle. The velocity (V) of the calculated spheroid was 0.0160 ± 0.0257 m/s with an acceleration (A) of 0.0366 ± 0.0204 m/s². Considering acceleration on y -axis, minimum and maximum values were $a_{y\text{ minimum}} = -0.015$ m/s² and $a_{y\text{ maximum}} = 0.0052$ m/s² (minus sign indicates downward direction), the percentage of gravity of this minimum and maximum vertical acceleration perceived by the HEK293 cells in the HARV culture system were $\%g_{\text{minimum}} = 0.153\%$ (downward direction) and $\%g_{\text{maximum}} = -0.053\%$ (where minus sign implies against the gravity direction), and this is the fraction of gravity considering $g = 9.81$ m/s². The effect of gravity is minimum in the downward direction, compensated for the rotational system. The comparison between results obtained from experiments performed in Earth's inherent gravity and the ones performed in "true" microgravity (ISS, manned and unmanned spaceflight) or simulated microgravity (rotating walled vessels, clinostats, and rpm machines) allows to observe the biological response of cells in a microgravity environment. The reported magnitude at which microgravity effects can be observed is in the range of 10^{-2} to $10^{-6}g$ [8, 9, 25, 26].

3.2. HEK293 Cell Culture Characterization under Simulated Microgravity Conditions (HARV, 25 rpm; SMGC) and under Earth's Gravity Conditions (Shake Flask Cultures, 100 rpm; EGC)

3.2.1. 293HEK Cell Growth. The growth of HEK293 cell cultures in Excell 293 medium without serum under SMGC at 25 rpm and EGC in shaken flasks at 100 rpm was compared

and is shown in Figure 2(a), A. Specific growth rate for SMGC was 0.0221 h^{-1} with a doubling time of 31 h, and specific growth rate was 0.0247 h^{-1} with a doubling time of 28 h for the EGC. Cell viability for cultures in SMGC was $86\% \pm 4\%$, and for EGC (shaken flask), the viability was $80\% \pm 2\%$ at 144 h. As shown, it is observed that the microgravity condition does not affect the culture development. The calculated values for doubling time for both conditions are within the reported range of 24 h to 56 h for the HEK293 cell line in Excell 293 serum-free medium in Earth's gravity conditions [27, 28]. Doubling time values between SMGC and EGC do not differ significantly, so it can be asserted that the 25 rpm operating condition of the HARV does not negatively impact the growth and viability of HEK293 cells. As we explained before, the choice of shaking cultures of HEK293 cells in suspension as ground gravity control is due to the fact that these are the standard culture conditions for recombinant protein production [29]. It is not possible to use the same speeds at ground and microgravity conditions due to the fact that such values are not comparable, and they are not either optimal for culture development. Cells grown in shaken flasks need a speed of 100 rpm as optimal condition for culture aeration and mass transfer [30, 31] while cells in the HARV bioreactor need an operating speed of 25 rpm to generate the simulated microgravity condition, which was determined in the present work (highlight) following the criteria established by Nickerson et al. for bacteria and particles [32].

Figure 2(a), B shows the process identification by the DNN, the integration of the structure (4), and the adaptation law (3), which allow to represent the estimated differential equation governing the behavior of the variable $x_1(t)$ = cell concentration (cell/mL). For both experimental conditions, the quadratic identification error (DNN estimation vs. experimental data) was determined over the complete time being less than 5% for both cases. This confirms the adaptation and the capacity of the DNN to accurately model this variable. Equivalent results and quality of approximation were obtained for the complete set of state vector variables in all the experimental conditions. Figure 2(a), C shows the growth productivities (cell/mL³h) for both conditions calculated by the DNN approach (2). Both the SMGC and EGC begin to increase their growth rate at 24 h, maximum growth was observed between 48 and 72 h, and from then on, there is a decrease in such a value. After 120 h, there is an increase in the growth productivity under SMGC with respect to the EGC. As reported previously by Lorenzo et al. [27], cell viability remains above 80% at 144 h, and the doubling time is within what is reported in the literature of HEK293 cell cultures in commercial serum-free media for recombinant protein production processes. It should be noted that there are no reference values for HEK293 cell cultures in microgravity environments, so the values reported for EGC in a serum-free medium were considered as a reference.

Complex processes such as the HARV bioprocess are traditionally modeled based on material balances and kinetic relationships; this approach grows rapidly in assumptions that must be considered to keep the number of parameters involved in the equations in a bounded number. Once the

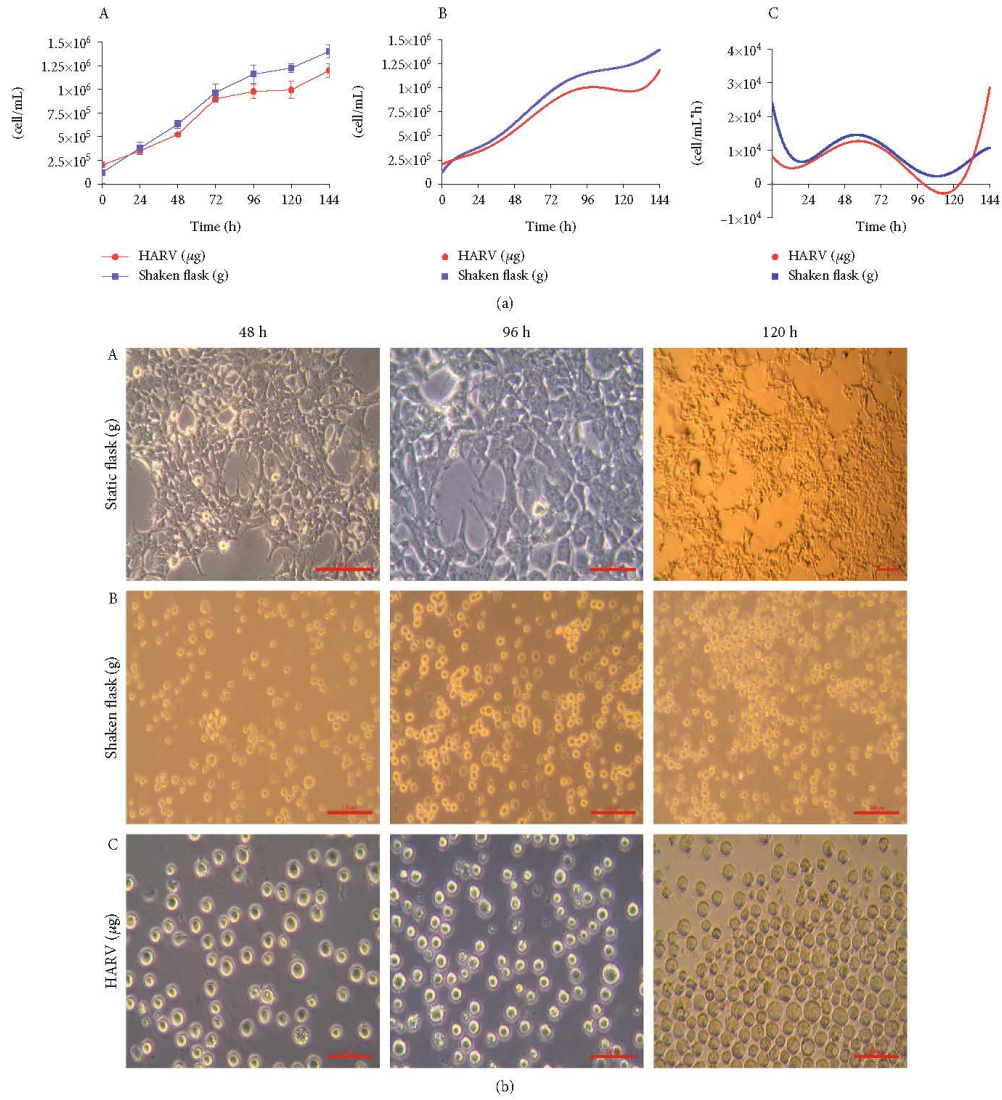


FIGURE 2: (a) Growth of HEK293 cell culture under SMGC. (A) Growth kinetics of HEK293 cell cultures in the serum-free medium under SMGC and EGC. The doubling time (dt) for μg cultures was 31 h compared to 28 h for EGC in the shake flask. (B) Estimation of HEK293 cell culture growth using a DNN from experimental data. (C) Estimation of cell growth productivities for SMGC and EGC calculated from the DNN approach. Maximum cell growth productivities are observed between 48 h and 72 h, after which a decrease in growth rate is observed for both conditions. (b) Morphology of HEK293 cell cultures at 48 h, 96 h, and 144 h 20x. (A) Static HEK293 cell culture in serum-free medium under EGC 20x. Scale bar corresponds to 200 microns (red). (B) HEK293 cell culture in the shake flask in the serum-free medium under SMGC. Scale bar corresponds to 100 microns (red). (C) HEK293 cell culture in serum-free medium in HARV bioreactor under SMGC. The scale bar corresponds to 200 microns (red). An evident morphological change is observed. SMGC in the serum HARV bioreactor allows the development of suspension cultures where the cells are spherical without aggregate formation. The EGC in static cultures promotes cell adhesion while in shaken flask cultures the formation of cell aggregates is observed.

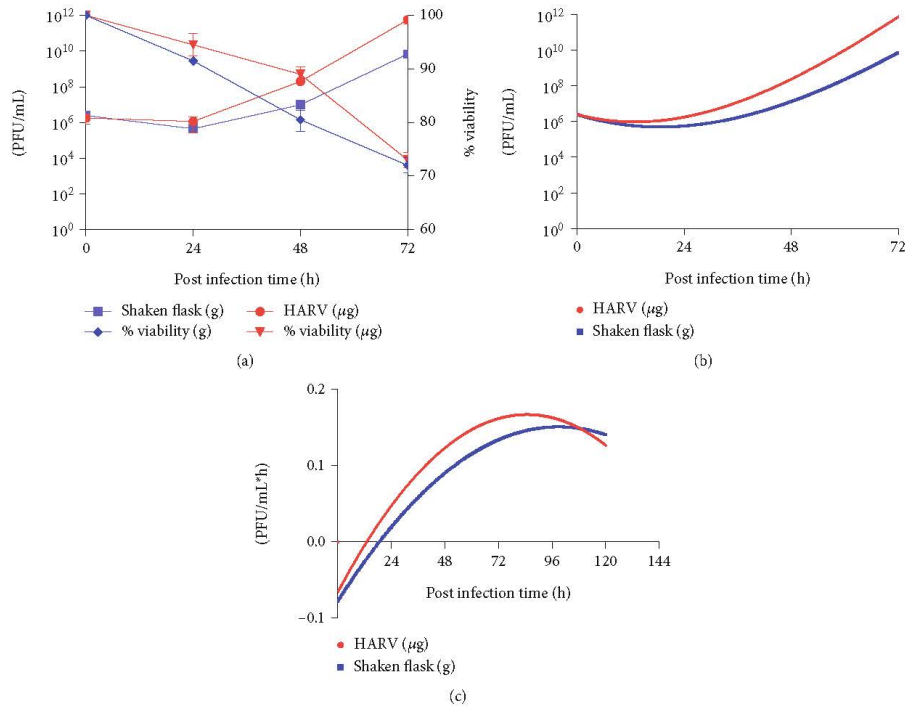


FIGURE 3: Production of Ad5/g-inf in 293HEK cells under SMGC. (a) Titer of infectious viral particles determined by end-point dilution at 72h postinfection and % of viability. (b) Estimation of viral titer by a differential neural network (DNN) in HEK293 cell cultures from experimental data. (c) Volumetric production rate of adenoviral particles. As previously reported, the production of adenoviral particles starts after 24 h postinfection in both conditions. The SMGC favored the viral vector production by two exponential values reflecting the value in the volumetric production rate which maximum value was reached at 81.1 h in comparison to the EGC value of 96 h postinfection.

model is derived, each proposed parameter must be calculated, and this implies an extra set of additional experiments to validate them, a situation that in practical conditions is not feasible due to the time consumption and the constant change in real conditions, especially if we pursue the control and optimization of the process; in our case, the microgravity condition is an additional factor to be considered. This situation is avoided through the adaptation strategy of differential neural networks. In this study, an artificial ordinary differential equation system has been implemented as a strategy to model (dynamic identification) the behavior of batch culture of animal cells; with this, we have generated a model that can be used in control applications; this is the first result and the base to propose a future optimization scheme, although this will imply changes in the experimental scheme; setting a control input, it means a fed-batch or continuous operation mode. The modeling strategy based on differential neural networks has proven that it can efficiently approximate the variables involved in the process, thereby becoming an alternative to obtain a representation of a complex process, such as the one implemented, for prac-

tical implementations. In this work, we present only the identification (modeling) of the batch system without integrating a control strategy, which would imply a fed-batch scheme or a continuous culture scheme to have a control input. However, once the identification scheme based on differential neural networks is available, there is an artificial structure to propose a controller. An option for this type of process is model-predictive control, where the system model comprises the differential equations of the differential neural network. This strategy allows for predicting the response in a defined time horizon to solve the optimal control based on the system's current state given by the differential neural network model.

The morphological changes of HEK293 cell cultures in Excell 293 serum-free medium cultures at 48 h, 96 h, and 144 h are shown in Figure 2(b). HEK293 cell cultures in serum-free medium in EGC at static culture using T-flasks adhere to the substrate, showing a typical morphology of an anchorage-dependent culture: formation of an extracellular matrix and irregularly and elongated shaped cells [20] (Figure 2(b), A). Suspension cultures in the shake flask under

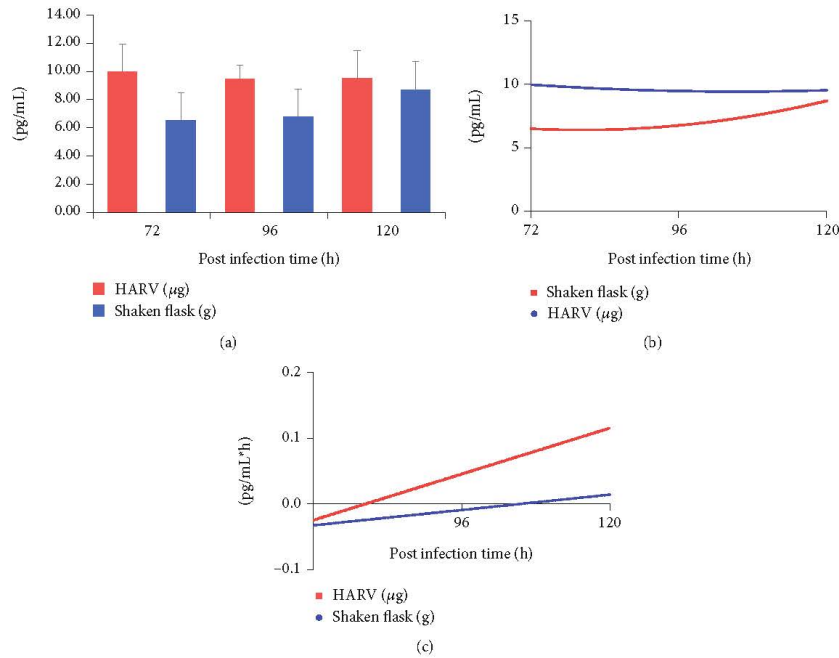


FIGURE 4: Production of recombinant gamma interferon in 293HEK cells under SMGC. (a) Recombinant gamma interferon concentration determined from supernatants at 72, 96, and 120 h. (b) DNN approach of recombinant gamma interferon concentration with corresponds to the observed experimental data. (c) Gamma interferon volumetric production rates. It is observed that the SMGC predicts a higher volumetric production rate at SMGC (up to $0.11 \text{ pg/mL}\cdot\text{h}$ for the HARV culture at 120 h postinfection) compared to the EGC values (up to $0.01 \text{ pg/mL}\cdot\text{h}$ for the shake flask). As observed, no significant difference in concentration was obtained between both conditions, but there is a trend to increase the recombinant protein production in the case SMGC.

EGC are presented in Figure 2(b), B. As observed, the culture tends to form aggregates. This morphology has already been reported in the description of the process of adaptation of anchorage-dependent HEK293 cell cultures to suspension cultures (Figure 2(b), B) [3]. In SMGC, cells present the typical morphology of a homogeneous suspension culture, and no cell aggregates are observed (Figure 2(b), C). This phenomenon is the first time to be reported to our knowledge, and it could be an excellent tool to promote the generation of homogeneous suspension cultures. Until now, one of the main applications of the rotary cell culture system (RCCS) has been the provision of conditions to establish difficult cell cultures such as stem cells, showing that cell viability and morphology are not affected in such conditions [33, 34].

In principle, the phenomenon of mechanotransduction explains the changes in cells in real microgravity and simulated microgravity environments. Cells convert mechanical stimuli into biochemical signals by activating signaling cascades. It has been proposed that gravitational force plays a crucial role in the regulation of cellular and tissue homeostasis by inducing mechanical stresses experienced at the cellular level. It has been reported that the most evident morphological changes of cultured animal cells in SMGC

are alterations in cell shape, size, volume, and adhesion properties [35–37]. These morphological changes translate into alterations in transcription, transduction, and organization of the cellular cytoskeleton, mainly associated with microtubules and actin filaments [38].

3.3. *Ad5/γ-inf* and Gamma Interferon Production. To analyze the production of adenoviral vectors and recombinant protein, HEK293 cell cultures were infected using a multiplicity of infection (MOI) of 5 and a cell density of 0.6×10^6 cells/mL in serum-free medium at SMGC and EGC. As shown in Figure 3(a), viral titer at 72 h postinfection was 9.31×10^{11} PFU/mL and 9.17×10^9 PFU/mL, respectively, which means an increase of 101.5 times for SMGC. As observed, the percentage of cell viability was higher at SMGC than in the case of EGC. The identification by the DNN structure applied to the production of adenoviral particles converges to the experimental data, with an error less than 5% over the identification time. A higher production at the SMGC (Figure 3(b)) is observed. The calculation of volumetric production rates from the DNN network shows that within the first 24 h, the production of adenoviral particles starts at the SMGC, and the culture in the HARV favored the production

TABLE 1: Specific nutrient consumption rates of glucose and glutamine and specific production rates of lactate and glutamate under SMGC and EGC of HEK293 cell cultures.

Culture condition	qsGlu (pg/cel*h)	qsGln (pg/cel*h)	qpLac (pg/cel*h)	qpE (pg/cel*h)
HARV (SMGC)	666.22 ± 28.20	239.11 ± 14.10	115.08 ± 14.50	23.32 ± 10.70
Shaken flask (EGC)	536.19 ± 14.10	239.08 ± 21.2	142.43 ± 12.20	19.22 ± 8.30
HARV/ <i>Ad5/g-inf</i> (SMGC)	569.79 ± 28.20	4000.00 ± 70.77	817.77 ± 89.80	95.01 ± 21.20
Shaken flask/ <i>Ad5/g-inf</i> (GC)	1111.11 ± 35.30	495.43 ± 56.50	283.34 ± 40.40	39.82 ± 19.50

reaching the maximum value at 84.8 h (0.16 PFU/mL^h), while for the EGC, it is observed at 99 h (0.15 PFU/mL^h). Both conditions begin a deceleration of production later at 96 h (Figure 3(c)). Although specific data on adenovirus production under SMGC are not available, it has been reported that in some cases, microgravity conditions favor the infectivity and capsid assembly of Epstein-Barr virus, human norovirus, hepatitis E virus, and human cytomegalovirus [12, 39]. These observations are consistent with the results presented in this work and support the asseveration that SMGC plus the use of a chemically defined medium promotes a favorable condition to produce infective adenoviral vector particles.

In addition, the identification and quantification of gamma interferon were performed to demonstrate if the recombinant protein production was also affected by the SMGC. Gamma interferon concentrations determined from supernatants at 72, 96, and 120 h are shown in Figure 4(a). The concentration of gamma interferon was 9.53 pg/mL at 120 h for SMGC, while such a value was 8.72 pg/mL for EGC; this shows that there was not a statistically significant difference between both conditions. The low transgene expression is attributed to the fact that the HEK293/Ad5 is mainly directed to the adenoviral vector production. DNN approach with respect to gamma interferon production corresponds to the experimental data. The gamma interferon volumetric production rates maintain a maximum value of 0.11 pg/mL^h in SMGC and 0.01 pg/mL^h in EGC at 120 h for both cases. There is a higher trend to increase the value in the case of SMGC than in the case of EGC (Figure 4(b)).

3.4. Nutrient Consumption and By-Product Production.

Table 1 shows the specific rates of glucose and glutamine consumption, as well as the specific rates of lactate and glutamate production of HEK293 cell cultures in SMGC and EGC, which were calculated in the exponential phase of the cultures. In both SMGC and EGC, there are no drastic differences in the specific rates of glucose (qsGlu) and glutamine (qsGln) consumption. These glucose and glutamine consumption rates agree with other values reported for HEK293 cells in commercial serum-free medium [40]. Lactate and glutamate productions were found to be between previously reported values and without significant differences between the two conditions. However, in the case of cultures infected using the viral vector *Ad5/γ-inf*, glucose consumption decreases in SMGC (569.79 ± 28.20 pg/cel^h), and the rate of specific glucose consumption was observed to be 2-fold lower than in the case of EGC (1111.11 ± 35.30 pg/cel^h), causing an enhancement of nutrient uptake by the cells. The specific glutamine consumption is higher in SMGC than in EGC. This result is reflected in

the specific rate of glutamine consumption (4000.00 ± 70.77 pg/cel^h), while in EGC cultures, the specific rate of glutamine consumption is 495.43 ± 56.50 pg/cel^h, i.e., about 8 times more. The lactate formation rate (qpLac) shows a difference being lower in EGC with a value of 283.34 ± 40.40 pg/cel^h compared to the lactate formation rate in SMGC of 817.77 ± 89.80 pg/cel^h. This is related to the fact that HEK293 cells present a cometabolism of glucose and lactate, where lactate is transported to the cytosol and oxidised by mitochondria to generate pyruvate resulting in a more efficient cellular metabolism [41]. This metabolic model does not appear to be affected by SMGC. For glutamate production rates (qpE), a relationship with glutamine consumption is observed 95.01 ± 21.20 pg/cel^h for SMGC and 39.82 ± 19.50 pg/cel^h which explains the difference observed between SMGC and EGC.

4. Conclusion

The percentages of gravity minimum and maximum vertical perceived by the HEK293 cells in the HARV culture system were [%g]_{minimum} = 0.153% (downward direction) and [%g]_{maximum} = -0.053% (where minus sign implies against the gravity direction), and this is the fraction of gravity considering $g = 9.81 \text{ m/s}^2$. The effect of gravity is minimum in the downward direction, compensated for the rotational system. This condition generates benefits in the production of infective adenoviral particles, an order of magnitude above that observed in EGC and a better utilization of the nutrients in the culture medium. The applied differential neural network approach allows to generate a nonparametric model that converges to the dynamic process behavior. This set of adaptive differential equations allows to describe in continuous time the experimental data from the HEK293 cell culture in SMGC versus the data from cultures in EGC. Furthermore, it will allow us to propose a control strategy to optimize the process based on this modeling approach. The results obtained from these experimental sets show that SMGC has broad applications regarding the improvement of mammalian cell culture because it has been shown that this condition helps to get homogenous suspension cultures in an easier and faster way. In addition, the use of SMGC opens up doors to other possibilities such as viral vector production, which, nowadays, is a novel field in cell technology that should be more deeply explored; generation of esferoids as 3D models for nonclinical experimental models to evaluate the effect of different active pharmaceutical compounds; interaction of cells in a 3D models; and model development for cancer studies among other interesting applications.

Data Availability

Data is available on request. Carlos A. Távira Montalván is authorized to share data information about kinetics and cell calculation. His contact information is carlos.taviramontalvan@uaem.edu.mx. Alejandro García-González is authorized to share data information about math modeling. His contact information is alexgargo@tec.mx.

Disclosure

We declare that this manuscript is original, has not been published before, and is not currently being considered for publication elsewhere.

Conflicts of Interest

Carlos A. Távira-Montalván, Alejandro García-González, and Angélica Meneses-Acosta declare no conflict of interests.

Authors' Contributions

The corresponding author confirms that the manuscript has been read and approved for submission by all the named authors. Carlos A. Távira-Montalván developed the experimental work, the analysis and discussion of results, and the writing of this manuscript. Alejandro García-González contributed to the DNN establishment and mathematical analysis as well as the financial support for this publication. Angélica Meneses-Acosta contributed the original idea, conceptualization, result discussion, and conclusion as well as the revision of this work.

Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México (CONACYT) and Agencia Espacial Mexicana (SCT, México). Dr. Meneses-Acosta thanks the CONACYT-AEM-2015 Project (262872) for their financial support used in the development of this project. Carlos Távira thanks the CONACYT's graduate scholarship program (no. 668180). Facilities and equipment were supported by the INFR-2014 Project (226271). We thank Dr. Sergio Alcalá Alcalá and Dr. Jose Antonio Serrato Pérez for their valuable comments.





References

- [1] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5," *Journal of General Virology*, vol. 36, no. 1, pp. 59–72, 1977.
- [2] S. Singh, R. Kumar, and B. Agrawal, "Adenoviral vector-based vaccines and gene therapies: current status and future prospects," in *Adenoviruses*, p. 10, IntechOpen, 2019.
- [3] M. Malm, R. Saghaleyni, M. Lundqvist et al., "Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, article 18996, 2020.
- [4] J. D. Rubin, T. V. Nguyen, K. L. Allen, K. Ayasoufi, and M. A. Barry, "Comparison of gene delivery to the kidney by adenovirus, adeno-associated virus, and lentiviral vectors after intravenous and direct kidney injections," *Human Gene Therapy*, vol. 30, no. 12, pp. 1559–1571, 2019.
- [5] D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov et al., "Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia," *The Lancet*, vol. 397, no. 10275, pp. 671–681, 2021.
- [6] M. Voysey, S. A. Costa Clemens, S. A. Madhi et al., "Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials," *The Lancet*, vol. 397, no. 10277, pp. 881–891, 2021.
- [7] F. C. Zhu, X. H. Guan, Y. H. Li et al., "Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial," *The Lancet*, vol. 396, no. 10249, pp. 479–488, 2020.
- [8] C. A. Nickerson, N. R. Pellis, and C. M. Ott, *Effect of Spaceflight and Spaceflight Analogue Culture on Human and Microbial Cells: Novel Insights into Disease Mechanisms*, Springer, 2016.
- [9] S. L. Wuest, S. Richard, S. Kopp, D. Grimm, and M. Egli, "Simulated microgravity: critical review on the use of random positioning machines for mammalian cell culture," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 971474, 8 pages, 2015.
- [10] M. Devarasetty, E. Wang, S. Soker, and A. Skardal, "Mesenchymal stem cells support growth and organization of host-liver colorectal-tumor organoids and possibly resistance to chemotherapy," *Biofabrication*, vol. 9, no. 2, p. 021002, 2017.
- [11] M. Moreno-Villanueva, A. H. Feiveson, S. Krieger et al., "Synergistic effects of weightlessness, isoproterenol, and radiation on DNA damage response and cytokine production in immune cells," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 11, p. 3689, 2018.
- [12] A. L. Radtke and M. M. Herbst-Kralovetz, "Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 62, 2012.
- [13] X. Lei, Y. Cao, Y. Zhang et al., "Effect of microgravity on proliferation and differentiation of embryonic stem cells in an automated culturing system during the TZ-1 space mission," *Cell Proliferation*, vol. 51, no. 5, article e12466, 2018.
- [14] D. Grimm, H. Schulz, M. Krüger et al., "The fight against cancer by microgravity: the multicellular spheroid as a metastasis model," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 6, 2022.
- [15] Y. Li, L. He, S. Pan et al., "Three-dimensional simulated microgravity culture improves the proliferation and odontogenic differentiation of dental pulp stem cell in PLGA scaffolds implanted in mice," *Molecular Medicine Reports*, vol. 15, no. 2, pp. 873–878, 2017.
- [16] D. Selișteanu, D. Endrescu, V. Georgeanu, and M. Roman, "Mammalian cell culture process for monoclonal antibody production: Nonlinear modelling and parameter estimation," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 598721, 16 pages, 2015.
- [17] L. Ljung, "Perspectives on system identification," *Annual Reviews in Control*, vol. 34, no. 1, pp. 1–12, 2010.

- [18] K. Kaheman, J. N. Kutz, and S. L. Brunton, "SINDy-PI: a robust algorithm for parallel implicit sparse identification of nonlinear dynamics," *Proceedings of the Royal Society A*, vol. 476, no. 2242, p. 20200279, 2020.
- [19] J. Schoukens and L. Ljung, "Nonlinear system identification: a user-oriented road map," *IEEE Control Systems*, vol. 39, no. 6, pp. 28–99, 2019.
- [20] M. N. Romero, *Construcción y evaluación de vectores moleculares que expresen interferón gamma en células humanas como potencial tratamiento inmunostimulador*, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2015.
- [21] M. A. Ramakrishnan, "Determination of 50% endpoint titer using a simple formula," *Psychological Bulletin*, vol. 6, no. 1, pp. 27–28, 1909.
- [22] R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, John Wiley & Sons, 2010.
- [23] C. Sosa-García, *Optimización del sistema de expresión HEK293/AD5-IFN-gamma humano mediante el manejo de la densidad celular y la multiplicidad de infección*, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2018.
- [24] M. S. Gradilla-Hernández, A. García-González, A. Gschaedler et al., "Applying differential neural networks to characterize microbial interactions in an ex vivo gastrointestinal gut simulator," *Processes*, vol. 8, p. 593, 2020.
- [25] S. Brungs, M. Egli, S. L. Wuest et al., "Facilities for Simulation of Microgravity in the ESA Ground-Based Facility Programme," *Microgravity Science and Technology*, vol. 28, no. 3, pp. 191–203, 2016.
- [26] T. C. Chao and D. B. Das, "Numerical simulation of coupled cell motion and nutrient transport in NASA's rotating bioreactor," *Chemical Engineering Journal*, vol. 259, pp. 961–971, 2015.
- [27] E. Lorenzo, L. Méndez, E. Rodríguez et al., "Plasticity of the HEK-293 cells, related to the culture media, as platform to produce a subunit vaccine against classical swine fever virus," *AMB Express*, vol. 9, no. 1, p. 139, 2019.
- [28] R. Román, M. Farràs, M. Camps et al., "Effect of continuous feeding of CO₂ and pH in cell concentration and product titers in hIFN γ producing HEK293 cells: Induced metabolic shift for concomitant consumption of glucose and lactate," *Journal of Biotechnology*, vol. 287, no. October, pp. 68–73, 2018.
- [29] C. L. Chin, J. B. Goh, H. Srinivasan et al., "A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, 2019.
- [30] P. S. Chahal, E. Schulze, R. Tran, J. Montes, and A. A. Kamen, "Production of adeno-associated virus (AAV) serotypes by transient transfection of HEK293 cell suspension cultures for gene delivery," *Journal of Virological Methods*, vol. 196, pp. 163–173, 2014.
- [31] D. L'Abbé, L. Bisson, C. Gervais, E. Grazzini, and Y. Durocher, "Transient gene expression in suspension HEK293-EBNA1 cells," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1850, pp. 1–16, 2018.
- [32] C. A. Nickerson, C. M. Ott, J. W. Wilson et al., "Low-shear modeled microgravity: a global environmental regulatory signal affecting bacterial gene expression, physiology, and pathogenesis," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 54, no. 1, pp. 1–11, 2003.
- [33] K. D. Kaya, T. DiStefano, L. Gieser et al., "Accelerated and improved differentiation of retinal organoids from pluripotent stem cells in rotating-wall vessel bioreactors," *Stem Cell Reports*, vol. 10, no. 1, pp. 300–313, 2018.
- [34] S. Navran, "The application of low shear modeled microgravity to 3-D cell biology and tissue engineering," *Biotechnology Annual Review*, vol. 14, no. 8, pp. 275–296, 2008.
- [35] C. Buken, J. Sahana, T. J. Corydon et al., "Morphological and molecular changes in juvenile normal human fibroblasts exposed to simulated microgravity," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, 2019.
- [36] T. J. Corydon, V. Mann, L. Slumstrup et al., "Reduced expression of cytoskeletal and extracellular matrix genes in human adult retinal pigment epithelium cells exposed to simulated microgravity," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 40, no. 1–2, pp. 1–17, 2016.
- [37] V. Mann, D. Grimm, T. J. Corydon et al., "Changes in human foetal osteoblasts exposed to the random positioning machine and bone construct tissue engineering," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 6, p. 1357, 2019.
- [38] P. Bradbury, H. Wu, J. U. Choi et al., "Modeling the impact of microgravity at the cellular level: implications for human disease," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, 2020.
- [39] A. A. Brinley, C. A. Theriot, M. Nelman-Gonzalez et al., "Characterization of Epstein-Barr virus reactivation in a modeled spaceflight system," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 114, no. 3, pp. 616–624, 2013.
- [40] P. Emma and A. Kamen, "Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures," *Biotechnology Progress*, vol. 29, no. 1, pp. 275–284, 2013.
- [41] I. Martínez-Monge, J. Albiol, M. Lecina et al., "Metabolic flux balance analysis during lactate and glucose concomitant consumption in HEK293 cell cultures," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 116, no. 2, pp. 388–404, 2019.

Article

Melanin Nanoparticles Obtained from Preformed Recombinant Melanin by *Bottom-Up* and *Top-Down* Approaches

Sergio Alcalá-Alcalá ¹, José Eduardo Casarrubias-Anacleto ¹, Maximiliano Mondragón-Guillén ², Carlos Alberto Tavira-Montalván ², Marcos Bonilla-Hernández ¹, Diana Lizbeth Gómez-Galicia ³, Guillermo Gosset ⁴ and Angélica Meneses-Acosta ^{2,*}

¹ Laboratorio de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; sergio.alcala@uaem.mx (S.A.-A.)

² Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico

³ Farmacia Hospitalaria, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico

⁴ Departamento de Ingeniería Celular y Biotransformación, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico

* Correspondence: angelica_meneses@uaem.mx; Tel.: +52-7773297000 (ext. 3366)



Citation: Alcalá-Alcalá, S.; Casarrubias-Anacleto, J.E.; Mondragón-Guillén, M.; Tavira-Montalván, C.A.; Bonilla-Hernández, M.; Gómez-Galicia, D.L.; Gosset, G.; Meneses-Acosta, A. Melanin Nanoparticles Obtained from Preformed Recombinant Melanin by *Bottom-Up* and *Top-Down* Approaches. *Polymers* 2023, 15, 2381. <https://doi.org/10.3390/polym15102381>

Academic Editors: Antonio M. Borrenio-López, Concepción Valencia-Barragán, Esperanza Cortés Triviño, Adrián Tenorio-Alfonso, Clara Delgado-Sánchez and Helena Felgueiras

Received: 17 March 2023

Revised: 15 May 2023

Accepted: 16 May 2023

Published: 19 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Melanin is an insoluble, amorphous polymer that forms planar sheets that aggregate naturally to create colloidal particles with several biological functions. Based on this, here, a preformed recombinant melanin (PRM) was utilized as the polymeric raw material to generate recombinant melanin nanoparticles (RMNPs). These nanoparticles were prepared using *bottom-up* (nanocrystallization—NC, and double emulsion—solvent evaporation—DE) and *top-down* (high-pressure homogenization—HP) manufacturing approaches. The particle size, Z-potential, identity, stability, morphology, and solid-state properties were evaluated. RMNP biocompatibility was determined in human embryogenic kidney (HEK293) and human epidermal keratinocyte (HEKn) cell lines. RMNPs prepared by NC reached a particle size of 245.9 ± 31.5 nm and a Z-potential of -20.2 ± 1.56 mV; 253.1 ± 30.6 nm and -39.2 ± 0.56 mV compared to that obtained by DE, as well as RMNPs of 302.2 ± 69.9 nm and -38.6 ± 2.25 mV using HP. Spherical and solid nanostructures in the *bottom-up* approaches were observed; however, they were an irregular shape with a wide size distribution when the HP method was applied. Infrared (IR) spectra showed no changes in the chemical structure of the melanin after the manufacturing process but did exhibit an amorphous crystal rearrangement according to calorimetric and PXRD analysis. All RMNPs presented long stability in an aqueous suspension and resistance to being sterilized by wet steam and ultraviolet (UV) radiation. Finally, cytotoxicity assays showed that RMNPs are safe up to $100 \mu\text{g}/\text{mL}$. These findings open new possibilities for obtaining melanin nanoparticles with potential applications in drug delivery, tissue engineering, diagnosis, and sun protection, among others.

Keywords: melanin nanoparticles; preformed recombinant melanin; nanocrystallization; high-pressure homogenization; double emulsion—solvent evaporation

1. Introduction

Melanin is an irregular, amorphous polymer of high molecular weight, generated by the oxidative polymerization of various indole and phenolic compounds such as L-tyrosine or levodopa (L-DOPA), which forms graphite-like planar sheets that aggregate naturally in a hierarchical fashion to form colloidal structures that can reach diameters of hundreds of nanometers [1]. The physical properties that make melanin unique are its light-absorbing ability, chemical resistance, electrical conductivity, and its low or null solubility in organic solvents or acidic aqueous media [1,2]. This natural polymeric pigment is distributed in all taxa of nature in compact granules integrated into the cytoplasm of different cells such



Synthesis, structural characterization and antiproliferative activity on MCF-7 and A549 tumor cell lines of $[\text{Cu}(\text{N-N})(\beta^3\text{-aminoacidate})]\text{NO}_3$ complexes (Casiopéfnas[®])



Jonathan Román Valdez-Camacho^a, Yaquelinne Pérez-Salgado^a, Adrián Espinoza-Guillén^b, Virginia Gómez-Vidales^c, Carlos Alberto Tavira-Montalvan^d, Angélica Meneses-Acosta^d, Marco A. Leyva^e, María G. Vázquez-Ríos^a, Eusebio Juaristi^{e,f}, Herbert Höpff^a, Lena Ruiz-Azuara^b, Jaime Escalante^{a,*}

^a Centro de Investigaciones Químicas-BCBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Cuernavaca 62209 Morelos Mexico

^b Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, México DF 04510, México

^c Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, México DF 04510, México

^d Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Cuernavaca, 62209 Morelos Mexico

^e Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Avenida Instituto Politécnico Nacional # 2508, 07560 Ciudad de México, México

^f El Colegio Nacional, Luis González Obregón 25, Centro Histórico, 06020 Ciudad de México, México

ABSTRACT

The synthesis of three new mixed chelate copper (II) nitrate coordination compounds of the general formula $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{L})(\text{sol})]\text{NO}_3 \cdot 0-0.5(\text{sol})$ is reported, where phen is 1,10-phenanthroline and L is a β^3 -aminoacidate (β -alaninate for 1, 3-aminobutanate for 2 and 3-amino-3-cyclohexylpropanoate for 3), and the solvent (sol) is H₂O and/or MeOH. The complexes were characterized by elemental analysis, IR and UV-Vis spectrophotometry, EPR spectroscopy, effective magnetic moment, conductometric and cyclic voltammetric measurements as well as single-crystal X-ray diffraction (SCXRD) analysis. All complexes are mononuclear Cu(II) complexes with d^9 configuration. In solution, the compounds are 1:1 electrolytes and exhibit square-based pyramidal coordination polyhedra. Meanwhile, in the solid state the coordination geometries are square-based pyramidal for compounds 1 and 2, but distorted octahedral for compound 3 due to coordination of the nitrate counterion. *In vitro* studies revealed that compounds 1, 2 and 3 have growth inhibition activity against MCF-7 and A549 tumor cell lines. The clustering of the experimental half-wave potential values among the three complexes could be explained by the fact of that the substitution pattern was changed on the secondary ligand, while the primary ligand remains without any structural modification.

1. Introduction

Metal-based drugs offer some advantages over purely carbon-based organic compounds, e.g. the presence of charge may influence their solubility properties, the occurrence of different oxidation states of the metal frequently allows their participation in biological redox processes, the partially filled metal *d* shell generates particular electronic and magnetic properties, and different coordination geometries allow for structural modifications. In addition, in metal complexes the thermodynamic and/or kinetic stability can be varied depending on the ligands [1–4].

One of the most studied diseases is cancer and medicinal inorganic chemistry have been a field that has focused, e.g., on the development of new metal-based reagent as therapeutic and diagnosis agents of that human disease. The last decades have witnessed a significant number of metal complexes based on elements such as arsenic, antimony, bismuth,

gold, vanadium, iron, rhodium, titanium, gallium, nickel, zinc, copper, and platinum as new therapeutic and diagnosis agents [5,6]. In this regard, Cisplatin and its derivatives are still among the most widely employed metal-based drugs for cancer treatment, but unfortunately present toxicity [7]. In order to reduce the adverse effects of platinum-containing metal-based drugs, the use of compounds based on essential metal elements has been suggested [8–10]. In this context, copper complexes have been widely studied in terms of their capability to be used in cancer therapy [11].

Casiopéfnas[®] [8,9] are mixed chelate copper (II) complexes with the general formula $[\text{Cu}(\text{L}^1)_2\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$, where L^1 is the primary ligand (indispensable for the biological activity) corresponding to an aromatic diimine-type ligand (*N-N*) and L^2 is the secondary ligand required for completion of the coordination sphere. The secondary ligand is frequently a bidentate α -aminoacidate (*N-O*) or oxygen-only donor (*O-O*) compound (Scheme 1).

* Corresponding author.

E-mail address: jaimesc@uam.mx (J. Escalante).

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119542>

Received 27 August 2019; Received in revised form 17 February 2020; Accepted 18 February 2020

Available online 19 February 2020

0020-1693/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

PRIMARY RESEARCH

Open Access



Transregulation of microRNA miR-21 promoter by AP-1 transcription factor in cervical cancer cells

Sacnite del Mar Díaz-González¹, Eduardo Daniel Rodríguez-Aguilar², Angélica Meneses-Acosta³, Viviana Valadez-Graham⁴, Jessica Deas², Claudia Gómez-Cerón², Carlos Alberto Tavira-Montalván³, Alitzel Arizmendi-Heras², Julián Ramírez-Bello⁵, Mario Enrique Zurita-Ortega⁴, Berenice Illades-Aguilar¹, Marco Antonio Leyva-Vázquez¹, Gloria Fernández-Tilapa¹, Víctor Hugo Bermúdez-Morales², Vicente Madrid-Marina², Mauricio Rodríguez-Dorantes⁶, Carlos Pérez-Plasencia^{7,8} and Oscar Peralta-Zaragoza^{2*}

Abstract

Background: Gene expression profiles have demonstrated that miR-21 expression is altered in almost all types of cancers and it has been classified as an oncogenic microRNA. Persistent HPV infection is the main etiologic agent in cervical cancer and induces genetic instability, including disruption of microRNA gene expression. In the present study, we analyzed the underlying mechanism of how AP-1 transcription factor can active miR-21 gene expression in cervical cancer cells.

Methods: To identify that c-Fos and c-Jun regulate the expression of miR-21 we performed RT-qPCR and western blot assays. We analyzed the interaction of AP-1 with miR-21 promoter by EMSA and CHIP assays and determined the mechanism of its regulation by reporter construct plasmids. We identified the nuclear translocation of c-Fos and c-Jun by immunofluorescence microscopy assays.

Results: We demonstrated that c-Fos and c-Jun proteins are expressed and regulate the expression of miR-21 in cervical cancer cells. DNA sequence analysis revealed the presence of AP-1 DNA-binding sites in the human miR-21 promoter region. EMSA analyses confirmed the interactions of the miR-21 upstream transcription factor AP-1. CHIP assays further showed the binding of c-Fos to AP-1 sequences from the miR-21 core promoter in vivo. Functional analysis of AP-1 sequences of miR-21 in reporter plasmids demonstrated that these sequences increase the miR-21 promoter activation.

Conclusions: Our findings suggest a physical interaction and functional cooperation between AP-1 transcription factor in the miR-21 promoter and may explain the effect of AP-1 on miR-21 gene expression in cervical cancer cells.

Keywords: AP-1, Cervical cancer, HPV, miR-21

*Correspondence: operalta@insp.mx

² Direction of Chronic Infections and Cancer, Research Center in Infection Diseases, National Institute of Public Health, Av. Universidad No. 655, Cerrada los Pinos y Caminera. Col. Santa María Ahuacatlán, 62100 Cuernavaca, Morelos, Mexico
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

12.3 Dirección técnica de tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

TITULACIÓN POR TESIS Y EXAMEN
PROFESIONAL 6°
"CROMATOGRFIA PREPARATIVA COMO
PARTE DEL BIOPROCESO EN
PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS
FARMACÉUTICOS"

EL C. DIRECTOR QUE SUSCRIBE CERTIFICA QUE LAS
FIRMAS QUE APARECEN EN ESTA ACTA SON
AUTÉNTICAS Y LAS MISMAS QUE USAN LOS
C.C.PROFESORES MENCIONADOS EN ELLA

Cuernavaca, Mor 05 de DICIEMBRE del 2022

ACTA DE EVALUACIÓN PROFESIONAL

En el salón de actos: FACULTAD DE FARMACIA dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, de esta ciudad de Cuernavaca, el día SEIS del mes de DICIEMBRE del año DOS MIL VEINTIDÓS se reunieron los siguientes Catedráticos:

DRA. MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES

DRA. HILDA VÁZQUEZ LÓPEZ

DR. SERGIO ALCALA ALCALA

en FACULTAD DE FARMACIA designados como Sinodales Miembros del Jurado, fungiendo como Presidente el primero y como Secretario el último, para proceder a la Evaluación Profesional de la Carrera de: LICENCIADO EN FARMACIA del pasante: MOISES ADRIAN MORALES GONZALEZ con la Tesis Titulada

"CROMATOGRFIA PREPARATIVA COMO PARTE DEL BIOPROCESO EN PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS FARMACÉUTICOS" y que fue desarrollada bajo la dirección de DRA. ANGELICA MENESES ACOSTA y la codirección de M. EN F. CARLOS ALBERTO TAVIRA MONTALVAN. Enseguida los señores Sinodales lo declararon APROBADO POR UNANIMIDAD

en razón de que el sustentante reunió los requisitos establecidos en el Artículo 6º y demás disposiciones contenidas en el Reglamento de Titulación Profesional.

Acto continuo, el Presidente del Jurado le hizo saber el resultado de su Examen y le tomó la Protesta de Ley.

Siendo las 16:39 hrs. se dió por terminada la Evaluación, levantándose para constancia la presente Acta que firman los Miembros del Honorable Jurado.

Código de
verificación
27gQJProf
página 1 de 2



UA
EM

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**DESARROLLO DE UN BIOENSAYO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD
INMUNOESTIMULANTE DE INTERFERÓN GAMMA HUMANO
RECOMBINANTE EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE ORIGEN
HEMATOPOYÉTICO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN FARMACIA

PRESENTA:
BRENDA MICHELLE BAHENA MONDRAGÓN

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA

ASESOR TÉCNICO:
CDR. CARLOS ALBERTO TAVIRA MONTALVAN

Laboratorio 7 Biotecnología Farmacéutica FF-UAEM

octubre, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Facultad
de Farmacia

Compromiso al servicio de la salud

**“DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL
SISTEMA ESTABLE CHO-SpDNA3/IFN- γ PARA LA
PRODUCCIÓN DE IFN- γ HUMANO
RECOMBINANTE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA:

L. F. MIRNA RODRIGUEZ AGUILAR

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA

ASESOR TÉCNICO

MF. CARLOS ALBERTO TAVIRA MONTALVAN

CUERNAVACA, MORELOS

FECHA: JUNIO 2020

FACULTAD DE FARMACIA

**“Evaluación del cultivo de células HEK293
suplementadas con ExCyte®: efecto sobre
crecimiento celular, producción de vectores
adenovirales y proteína recombinante”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:

GUSTAVO ROJAS ORTIZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA

ASESOR TÉCNICO: M.F. CARLOS A. TAVIRA MONTALVÁN

Octubre 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

FACULTAD DE FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN DE LA
BIOCOMPATIBILIDAD DE ANDAMIOS DE
PHB CON NANOPARTÍCULAS DE MELANINA
EN MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN FARMACIA

P R E S E N T A:

**MAXIMILIANO JESÚS MONDRAGÓN
GUILLÉN**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA

ASESOR TÉCNICO:

M.F. CARLOS TAVIRA MONTALVAN

CUERNAVACA, MORELOS 2019



12.4 Participación en congresos

12.4.1 Nacionales




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

XIV
ENCUENTRO DE ESTUDIANTES
DE POSGRADO EN FARMACIA


UAFM
acuhad
de Farmacia
Unión Académica de Farmacia

La Facultad de Farmacia a través de la Secretaría de Investigación, la Jefatura de Posgrado y el Consejo Estudiantil de Posgrado

Otorga la presente

CONSTANCIA

Al: M.F. Carlos Alberto Távira Montalván

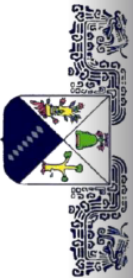
Por su participación como **ASISTENTE**

en el 14vo. Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia

Celebrado de forma virtual el 27 de noviembre del 2020, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Coordinador Comité Organizador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

A través de la Facultad de Farmacia

Oroiga la presente:



CONSTANCIA

di:

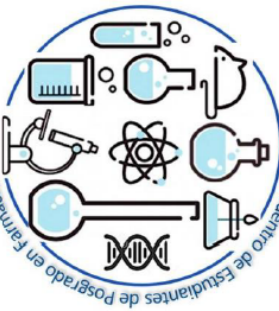
*Mina Rodríguez Aguilar, Yanna García-López, Carlos A. Taura-Montalván,
Angélica Meneses-Acosta y Nival A. Sánchez-Pacheco.*

*Por su participación en la presentación del cartel titulado "GENERATION OF STABLE
CELL LINES THAT PRODUCE RECOMBINANT GAMMA INTERFERON BY
CLONAL SELECTION USING CHO-S/PCDNA3/IFN-gamma AS A RANDOM
INTEGRATION SYSTEM" en el 13° Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia.*

Cuernavaca, Morelos a 21 de noviembre del 2019.



Dr. Efrén Hernández Balazar
Director de la Facultad de Farmacia



12.4.2. Internacionales



This is to certify that the abstract entitled

Evaluation of transduced cultures of MCF-7 cells with a first-generation adenoviral vector expressing the caspase-3 gene as a model for breast cáncer.

P028

by the following authors

C A Tavira-Montalvan, O Peralta-Zaragoza, A Meneses-Acosta

was presented at the

ESGCT Collaborative Virtual Congress 19-22 October 2021

Hildegard Büning

**Hildegard Büning ESGCT President
on behalf of the ESGCT Board**



Poster Excellence Award

THIS DOCUMENT HEREBY CERTIFIES THAT THE WINNING POSTER:

Production and characterization of HEK293 and adenoviral vectors using a simulated microgravity environment

By Carlos Alberto Távira-Montalván and Angélica Meneses-Acosta

WAS PRESENTED AT THE ISBIOTECH 9TH SPRING MEETING
HELD MARCH 4-6, 2019 IN NORFOLK, VIRGINIA USA

Keith L. Carson, CHE, MBA
Founder & Program Director







Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería

Yakult®

Otorgan la

**MENCIÓN HONORÍFICA DEL PREMIO ALFREDO SÁNCHEZ-MARROQUÍN 2019
A TESIS EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

en la categoría de **MAESTRÍA** o

CARLOS ALBERTO TAVIRA MONTALVÁN

Por el trabajo:

**CONSTRUCCIÓN GENÉTICA DE UN VECTOR ADENOVIRAL DE PRIMERA GENERACIÓN QUE
EXPRESE CASPASA-3 PARA INDUCIR MUERTE CELULAR EN CÉLULAS MCF7**

León, Guanajuato 27 de junio 2019

Dr. Alvaro Lara Rodriguez

Presidente de la Comisión de
Premios de la SMIBB

Dr. Adelfo Escalante Lozada

Presidente de la SMIBB



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería



sartorius

Otorgan el

PREMIO SARTORIUS A LOS MEJORES TRABAJOS LIBRES EN
CARTEL PRESENTADOS DURANTE EL XVIII
CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA LEÓN 2019

1er lugar

Mirna Rodríguez Aguilar, Yoanna García López, Carlos Alberto Távira Montalván, Angélica
Meneses Acosta

Por el trabajo:

**GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES PRODUCTORAS DE INTERFERÓN GAMMA
POR MÉTODO DE SELECCIÓN CLONAL UTILIZANDO CHO-S**

León, Guanajuato 28 de junio 2019

Dr. Alvaro Lara Rodríguez
Presidente de la Comisión de
Premios de la SMIBB

IQ.MBA Erick Sabido Ruiz
Gerente Comercial Sartorius

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente de la SMIBB



Poster Excellence Award

THIS DOCUMENT HEREBY CERTIFIES THAT THE WINNING POSTER:

Production and characterization of HEK293 and adenoviral vectors using a simulated microgravity environment

By Carlos Alberto Távira-Montalván and Angélica Meneses-Acosta

WAS PRESENTED AT THE ISBIOTECH 9TH SPRING MEETING
HELD MARCH 4-6, 2019 IN NORFOLK, VIRGINIA USA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Keith L. Carson".

Keith L. Carson, CHE, MBA
Founder & Program Director





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2022-11-24 13:21:27 | Firmante

Lq5XYZ+tXFIzOlbfzNEqbCf+me/LzqAJr+BIWbehbtpUJri36SYkY0i4q4HcAKsSiaFmAce+zc4ZvmS59vHI4EwPo8xIpv1yP3bHrAV9VnWicduNmthERv2KbzAY/Pxk9WKckITUs/z8sA0Q3Db/c29yOJlmbstOh1/hyE9l/jtbhkfkA1gh3o0uxqyLkOOnrRda5GKluqwCq2LKhTEM3ju0EJU02dKrm6bwX96DYcHi3ewxJ/kZIBkuLLeVBie3lub47wHlagflX5Y/Gh3RSPrH44gQw3+Z7q43nMu1dLbyHQIYfd1+tJKvIMOH3a1Hh5cVStx4XFsP630Z0k5g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[RFx3bWwtf](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Pm6ukS1IRQCwy4agvb7ygBCr5NCD2tH3>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Carlos Alberto Tavira Montalvan

Título de la tesis: “Análisis de la expresión de interferón gamma humano usando el sistema de células HEK293-Adenovirus en ambientes de microgravedad”

Grado a obtener:

 Maestría en Farmacia

 X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Sergio Alcalá Alcalá

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Si se aprueba tal como se presenta

 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

9/10/2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2023-10-09 11:53:40 | Firmante

K6lK8avt226Krubb7qBLWt+KHfZrIFt2VcT0YWqMpCj+fGPDyhy/sGG6k02YH7KDM4j0FCSoPPdN7rzn89VvDf4sQRkhP2E6W4rCx5Ba33mHxADJxjsBQ8VaEchhtiUGcMZU3oC
XO6kA10bXaZBTCwAypdISTFYAo/ftcCRvaqG5bNCCYbNcPSwGyAs58mbzNmH6nRmJVDIPL2kqkWuTTCul8f1CcnbMZpCb860c9zeMb9cogD91Ob9wedGJD/GZcvy1DisVU40
m1qAXiVEF+2Bfuybw/Eebt+G6DSwlms4PMG0I22bGVKXLvGTDFQ9fJwEcw8NRAmMm0CXnpzGLEA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[kgyWLEFvG](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/clvf4IDc4kJOEuoRo8DKcrTSvGSYFvR>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Carlos Alberto Tavira Montalvan

Título de la tesis: “Análisis de la expresión de interferón gamma humano usando el sistema de células HEK293-Adenovirus en ambientes de microgravedad”

Grado a obtener:

 Maestría en Farmacia

 X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Si se aprueba tal como se presenta

 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

9/10/2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2023-10-09 11:19:36 | Firmante

vqiVrN4fyyDkNxypWOHzZhqO//g9ShLMW7VyLVQXdYK5TSaJLj2EX8c0Gd92BMOT/LT0qaqZX5JhuVP3I6TeBa8iNelf2HI/c365OK24T1+/+HLiP6saBd7XXvEr854YPy3atCYkiM18ESXjWQWnjbOmzrdL6oazTHC3oqLk1S1XW3rJ8H2S2ecCjeor493JPIEHv3CrGwRxbf1eb7UnTwijoUkBnfZTMBedVwXpCm4uEIT1C2Z6bMiAwTNml4ReugGvYqfcZgo4IJWQpp yioAX/nSTwE9EfKs5ESd3Zoz3Dc27sPPVCfkS0wrNwyo+dYf1FTDRyB4XCdnnoik+0dg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Sh6Amk9Tq](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FuCaou6D18dlBmc3r8YXbGcfAqQoh9ew>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ALBERTO MENDOZA BÁRCENAS | Fecha:2023-10-09 13:19:50 | Firmante

JCe9fQQmL2ZFjhsXCGPH1IN6kpcTIT7vIb9jWnRb2GIl7HW+3BXohhyoLjwveYqAUh+3Mstkb/73nHJON0/b/gr+JJeQVxPEPC9RKsPj2YjVIZqK/5s8MyoRfxdggkKWE5dqHJLbB2/fQaDouFhVMCtOd2X230T1egOrmadSLyLRag/i07xdEHIC6T/nFo5oC9qsG7rEy1HtqP3MMHxsD36iFIOuw/pU+dRyxZiVz5psVEDvXTucD0mhtCPGiF1RqA8U1L8Jn3tJsWmQARDSQE30IBKLzG3jjMJGPblsZDn0UzGqBb0+uVa0sZDGUK1YiMaBOyyWy4thEnsYdZliw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[WcbR30JCI](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/U1uloMyRP9365rbWbueMTuqO4vpkR4Ep>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEJANDRO GARCÍA GONZÁLEZ | Fecha:2023-10-09 13:26:18 | Firmante

v20BMci2HMfLe5g5sxAW61eAzNuU/JUblg20XuSNnYWjFEsSq8vaYTkNo4U6JaHAt9I2vUYS0rk2huh2fBOZptX4sPO/E8N9pN16FM5/mvG3+LtkBPcgfkhL+DUnijgRhDaG08dm
Rk5sfjOyq89UPOqKz9+68qmYOYCnW2FARYGSusiOxYuT34LRqGL/k1wHLZVzkTNA dg3HM2clbEcOkhj6pcdRI0ROtRYIJs9KN9rs7c9FIlv0W1iLVqIbgNhiMAzO5x2dHL/KFe4tR
bmnFVBilJmko0IU/YhoLu2IAY9ByW2JNEB/6hk/MEI/9mQTMLfML+7GNCX8iJyqZlw2CQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[m2XknNyFE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/iNc1leHzetiv2MNLnqtKBWad34SH39bZ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESSICA NAYELLI SANCHEZ CARRANZA | Fecha:2023-10-09 09:50:57 | Firmante

JtBTZ3F9paU2Zxv/EIPZqRXri4+cliMhbrJMPd2qYU7gqKGuYLUshyMEzRoK2mvH89gSObdOIGmIco1DeHkkoQhL3C6QKuo+7tC2FNk7MECl6FzgLw5xPVIrT4PL6HYwgDS2kq
uTUg6Ts4bntf0l6GVm5Euc6kBzQPA4zUVILPnn8PYYkAdyaod7iz5ZhnPparoFAtIomPuEBdLEAM14BI+kZ1HLWlx4W5RP/6Eg0Llge7YMX9JmHveycJMQZkhODEQdvw3cnoqnZ
2StCimpqKH9tnUzl6dk2+RnYTKY1Oxw/ezcBsbhPnbpGvhWIMYsV0sGiuyKbPsLmU1NAHSa==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0EXLgj8Zy

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mGteqPMYgh3uZ9trXR7zqhCS3O9bKN1g>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Carlos Alberto Tavira Montalvan

Título de la tesis: “Análisis de la expresión de interferón gamma humano usando el sistema de células HEK293-Adenovirus en ambientes de microgravedad”

Grado a obtener:

 Maestría en Farmacia

 X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Oscar Peralta Zaragoza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Si se aprueba tal como se presenta

 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

9/10/2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OSCAR PERALTA ZARAGOZA | Fecha:2023-10-09 10:46:51 | Firmante

sgbnuYxjjZsZ7ze/uelNtoWfqiCv8nGmzkzg6w9gHovQZfLQYGuoQHnaUHC1MWuhP9GJFNYLi8wWlvnJv1E3MAxBE63taFZ6rZPIVRw8uLzk21mPhnz0boLWErm9uplzwZ3TLwKGT0lrtVFrZvdz5E+S9jAVGI+mP1IU+x/ALj+jHYK6cQBBGht4/dWB5O9ychPCgj37VgQimS1UbdcbS8gHH4AYMceUqG9EHck3Xpk5dHqmYRk2nY2molq2HlfxMFzL8eZkwXLgPOItoVT3eF3TN0WEhNTq6+HrWGGnER2XckfvRPKpWnooyTNh/AzJyYCtdzxJLcgBouwSdKn/fQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[NCoshvQSt](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/jGI1DvGQQc3Ws3ZKvhvk37ZMDD9tcep>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANGELICA MENESES ACOSTA | Fecha:2023-10-09 16:29:18 | Firmante

K2tBe+4WxtKGT2FhMdWZZOwjxla1aBiCxLzlbYolxdG5+MnrDyofjB5vo4FeK+feZLSjmNh6swe3poRAvTY4qZ5szaCzt4u6+CvA45nmH6VKwAHVShjJ1N+UfPesJnUHqIWA69bA
nRP0IHniT6ZKmEDtEr6+r1zbWgnLYfLeleMdjE/iGPK+YeWtVsd8runzICluwg3ImVyLxSf60JsGMS5RTVL6TPEeTzVpOY0NhJC27UMXHkBDlgjR0pScP8TP1bCEa14764veEimi8
BvDrdkwUOP/nKkIRQHVzQVilV1K215yrzkIzCqW/UW2s2u+xQ4QPcakp6RQ0vTT6wYg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[5cB8x9IEv](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/KrfYIFeW0K7IqqNVh7KmElcj6CfnfBuP>

