

Modelación de la cinética de crecimiento del cultivo en perfusión de células de mamíferos

✉ Luis Y Hernández¹, Diaselys Castro¹, Pablo de la A Vitón¹, Oscar Pérez², Mercedes Rodríguez²

¹Centro de Inmunología Molecular, CIM Ave. 15 esquina 216, Atabey, Playa, CP 11 600, Ciudad de La Habana, Cuba

²Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría Calle 114 No. 11 901 e/ 119 y 129, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: yunier@cim.sld.cu

RESUMEN

Partiendo de las ecuaciones básicas del balance de masa, se llegó a las ecuaciones particulares que describen el comportamiento del crecimiento celular, del consumo de sustrato y de la formación de producto en los fermentadores de tanque agitado y cultivo en perfusión a escala de banco (30 L de volumen de trabajo). En función de los datos reales de las corridas, se desarrolló el ajuste estadístico de un polinomio de tercer orden, al factor de paso de las células a través de la membrana del filtro rotatorio (*spinfilter* [θ]), para describir su comportamiento en función del tiempo, ya que no se tiene una idea clara del comportamiento hidrodinámico del sistema, el cual será desarrollado en trabajos futuros. Con las ecuaciones desarrolladas y utilizando el programa VisSim, se simuló el proceso de operación, y se obtuvo una semejanza con los datos reales. En dicho modelo se analizaron la influencia de la concentración celular, la velocidad de crecimiento específica y la velocidad de formación específica de producto, durante el proceso, en los años 2000 y 2001; y se compararon ambos años.

Palabras clave: Cultivo en perfusión, filtro rotatorio, células de mamíferos, cinética de crecimiento

Biotechnología Aplicada 2009;26:226-231

ABSTRACT

Modelation of growth kinetics of mammalian cells in perfusion culture. Specific equations describing the behavior of cell growth, substrate use and product formation in stirred tank fermentors and cell bank-scale perfusion cultures (30 L working volume) were developed from basic mass balance equations. A third-order polynomial equation was statistically fitted to the restricted cell passage through the screen [θ] obtained from experimentally run data to model the behavior of the culture with time, since a clear description of the hydrodynamics of the system has not yet been developed. The results of the simulation of the operation process with the VisSim software application using these equations agreed with the experimental data available. The model was used to analyze the influence of cell concentration, specific growth rate and specific product formation rate on the process during years 2000 and 2001, comparing the results obtained for both periods.

Keywords: Perfusion culture, spinfilter, mammalian cells, growth kinetics

Introducción

Para propagar células de mamíferos, se pueden emplear diferentes modos de cultivos. Los modos básicos son el cultivo por lote, el cultivo por lote alimentado, el cultivo continuo, el cultivo continuo con recirculación de biomasa [1, 2] y el cultivo en perfusión [3]. Este último permite trabajar a altas densidades celulares, y debe estar equipado con un dispositivo para la retención de células, tales como un filtro rotatorio o *spinfilter* [4, 5]. Para ello, es necesario desarrollar las ecuaciones que caractericen el proceso cinético, debido a que no se han descrito modelos, ni están claramente definidas las etapas de crecimiento de este modo de cultivo. Luego es preciso comprobar la validez de las ecuaciones, mediante la simulación y un programa de computación [6].

Materiales y métodos

Materiales

Biorreactor

El fermentador de 41 L (30 L efectivos) con diámetro de 0.27 m, altura de 0.7164 m, altura efectiva de

0.52 m, diámetro de impelente: 0.088 m tipo propela, fabricado por CHEMAP AG (CMF 400) [6].

Filtros rotatorios

Los filtros rotatorios (CHEMAP AG) que se emplean en los biorreactores de 41 L son cilíndricos, de acero inoxidable (las mallas son del mismo material, con un poro de diámetro de 20 μm) y con un diámetro de 0.088 m y la altura de 0.152 m [6].

Línea celular

La línea celular hospedera fue NSO/H7 [6].

Medio de cultivo

Se utilizó un medio de cultivo libre de proteínas [6].

Métodos

Cultivo en perfusión

El medio se inyectó en el fermentador por medio de una bomba peristáltica (Watson Marlow 504 U). Se mantuvo el nivel constante por medio de un controlador que activa una bomba peristáltica (Watson Mar-

1. Aiba S, Arthur EH, Nancy FM. Biochemical Engineering. Edición Revolucionaria, La Habana; 1970.

2. Monbouquette HG. Modeling high-biomass-density cell recycle fermentors. *Biotechnol Bioeng* 1992;39:498-503.

3. Yabannavar VM, Singh V, Connelly N. Mammalian cell retention in a spinfilter perfusion bioreactor for mammalian cell. *Biotechnol Bioeng* 1992;43:159-64.

4. Hartikka M, Vihko P, Södervall M, Hakalahti L, Tornaiainen P, Vihko R. Radiolabelling of monoclonal antibodies: optimization of conjugation of DTPA to F(ab')₂ fragments and novel measurement of the degree of conjugation using Eu (III)-labeling. *Eur J Nucl Med* 1989;15:157-61.

5. Tolbert WR, Feder J., in: Annual Reports on Fermentation Processes 1983; Vol. 6, Ed. 39.

6. Hernández LY, Castro LD. Análisis del proceso de fermentación en perfusión del monoclonal hR3 a escala de banco. Trabajo de tesis. ISP José Antonio Echeverría 2001. Cuba.

low 504 U) que succionó el producto por el tope del filtro rotatorio [6].

Programa de simulación VisSim

El VisSim es un programa de simulación de ecuaciones, creado por la corporación Visual Solutions. Está disponible sobre formato de MS/Windows y UNIX/X [6].

Programa estadístico

Para la modelación del factor θ , se empleó el programa Statistica para Windows, versión 4.3 (1993), creado por la compañía Stat Soft [6].

Resultados y discusión

Desarrollo de las ecuaciones de balance de materiales

Con el objetivo de desarrollar las ecuaciones que representan el comportamiento del fermentador que opera a perfusión, es necesario considerar tres etapas para el crecimiento de las células, que se diferencian entre sí [6, 7]: 1) crecimiento exponencial en estado no estacionario (E1); 2) crecimiento exponencial a flujo continuo en estado no estacionario (E2); y crecimiento limitado a flujo continuo en estado estacionario (E3) (Figura 1).

La primera etapa constituye el crecimiento antes de comenzar la alimentación con el flujo de perfusión. Se considera que el tiempo en la fase de adaptación es muy corto, debido a que las células, después de inoculadas, encuentran las condiciones óptimas para su propagación exponencial. La segunda etapa representa el crecimiento exponencial con flujo de perfusión, hasta que se alcanza el estado estacionario. La tercera etapa representa el crecimiento estacionario con flujo de perfusión.

Teóricamente, el tiempo de las dos primeras etapas debe ser mucho menor que el de la tercera.

Ecuaciones que describen la cinética del cultivo a perfusión

El análisis del comportamiento de la primera zona es análogo al descrito en el cultivo *batch*: se utiliza la ecuación general de balance de masa para este sistema [6]:

$$FpX_0 + \mu XV = \theta(F + Fp)X - \theta X_s F + V \frac{dX}{dt} + \alpha XV \quad (1)$$

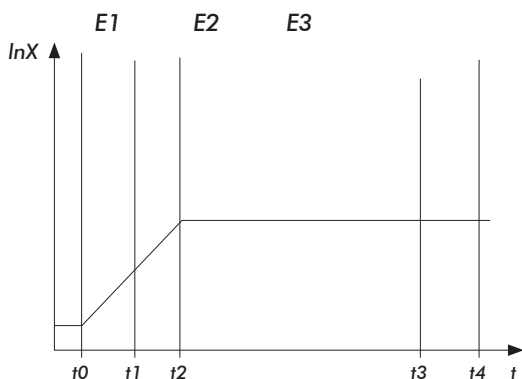


Figura 1. Representación de las etapas en que se divide la perfusión.

Donde:

Fp : flujo de perfusión (L/h).

X_0 : concentración de biomasa en el biorreactor (g/L).

μ : velocidad de crecimiento específica (h^{-1}).

X : concentración de biomasa en el biorreactor (g/L).

V : volumen del biorreactor

θ : fracción de células que pasan hacia el interior del filtro rotatorio.

F : flujo de intercambio (L/h).

X_s : concentración de biomasa en el filtro rotatorio (g/L).

α : velocidad de muerte específica (h^{-1}).

El factor θ se puede definir como la fracción de células que pasan hacia el interior del filtro rotatorio [6]:

$$\theta = \frac{X_s}{X} \quad (2)$$

Como X_s y X varían con el tiempo, entonces $\theta = F(t)$.

Crecimiento exponencial en estado no estacionario

Como no existe entrada ni salida de biomasa, y el término de muerte es despreciable con respecto al crecimiento exponencial de las células, y teniendo en cuenta que al inicio de la operación la malla del filtro rotatorio está completamente limpia, pues la cantidad de células que entra al filtro es igual a la cantidad de células que salen de él, se obtuvo:

$$\begin{aligned} \mu_{MAX} X &= \frac{dX}{dt} \\ X &= X_0 e^{\mu_{MAX} t} \end{aligned} \quad (3)$$

Donde:

μ_{MAX} : velocidad de crecimiento específica máxima (h^{-1})

Y resultó la misma ecuación del cultivo *batch* [1].

Crecimiento exponencial a flujo continuo en estado no estacionario

Para la segunda etapa, según la literatura [3, 6], en que comienza la perfusión, el sistema sigue creciendo exponencialmente, porque aún hay sustrato acumulado; es decir, hay una cantidad de nutriente suficiente para el crecimiento celular a su máxima velocidad específica. Partiendo de la ecuación (1) y con:

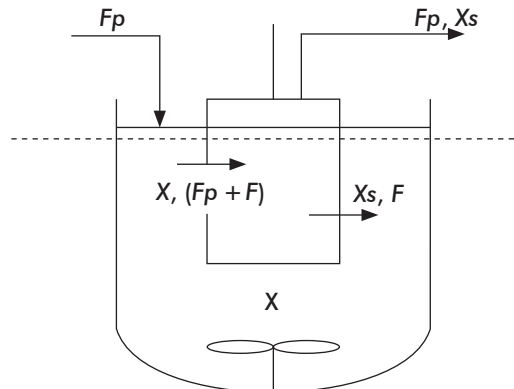


Figura 2. Representación esquemática de un biorreactor en perfusión. F : flujo de intercambio (L/h); Fp : flujo de perfusión; X_s : concentración de biomasa en el filtro rotatorio (g/L).

7. Robinson DK, Memmert KW. Kinetics of recombinant immunoglobulin production by mammalian cells in continuous culture. *Biotechnol Bioeng* 1991;35:972-6.

$$\mu XV = \theta(F + Fp)X - \theta X_s F + V \frac{dx}{dt} \quad (4)$$

En esta etapa la malla del filtro está parcialmente obstruida debido al crecimiento de las células y restos de estas, depositados en la superficie del filtro, lo que provoca que el flujo de intercambio (F) sea despreciable con respecto al flujo de perfusión (Fp); mientras que el crecimiento es de forma exponencial y la velocidad específica de muerte (α) es despreciable con respecto a la velocidad específica de crecimiento ($\mu = \mu_{MAX}$) [6].

Entonces, la ecuación se reduce a:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{MAX} X - \theta DX \quad (5)$$

Donde:

D : velocidad de dilución (h^{-1}).

Al resolver esa ecuación diferencial separable se obtiene que:

$$X(t) = X_0 e^{\{\mu_{MAX} t - D \int_0^t \theta(t) dt\}} \quad (6)$$

Para el sustrato:

$$F_0 S_0 = FS + \frac{d(VS)}{dt} - \frac{\mu XV}{Y_{XS}} \quad (7)$$

Donde:

F_0 : flujo de intercambio inicial (L/h).

S_0 : concentración de sustrato inicial (g/L).

S : concentración de sustrato (g/L).

Y_{XS} : rendimiento biomasa sustrato.

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu_{MAX} X}{Y_{XS}} \quad (8)$$

Al resolver esa ecuación diferencial de primer orden se obtiene que:

$$S(t) = S_0 - (1 - e^{-Dt}) \left[\frac{\mu_{MAX}}{DY_{XS}} \right] X(t) - \left[\frac{X(t) - X_0}{Y_{XS}} \right] e^{-Dt} \quad (9)$$

Para el producto, a partir de la ecuación:

$$FpP_0 + \mu XV Y_{PS} = (Fp + F)X + V \frac{dP}{dt} \quad (10)$$

Donde:

P_0 : concentración de producto inicial (g/L).

Y_{PS} : rendimiento producto/biomasa.

P : concentración de producto (g/L).

$$\frac{dS}{dt} = \mu_{MAX} XY_{PX} - DP \quad (11)$$

Aplicando ecuaciones diferenciales de primer orden:

$$P(t) = (1 - e^{-Dt}) \left[\frac{Y_{PX} \mu_{MAX}}{D} \right] X(t) + Y_{PX} (X(t) - X_0) e^{-Dt} \quad (12)$$

Crecimiento limitado a flujo continuo en estado estacionario

En la etapa final del proceso, luego de un gran consumo de sustrato debido a la alta densidad celular lograda, se llegó a un punto donde comenzó a limitarse la disponibilidad de nutriente. Esto provocó un cambio en la velocidad de crecimiento específica y la velocidad de muerte específica de la célula, hasta que se estabilizó la concentración celular alrededor de un valor, lo que equilibró el crecimiento, la fuga y la

muerte celular, y se alcanzó una etapa estacionaria, que depende del flujo de sustrato.

Teniendo en cuenta la tercera etapa como un proceso estacionario:

El balance de biomasa partiendo de la ecuación (1) se reduce a:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= \mu X - \alpha X - \theta DX = 0 \\ \mu - \alpha &= \theta D \\ \mu^* &= \theta D \end{aligned} \quad (13)$$

Donde:

α : velocidad específica de muerte (h^{-1}).

A : área total de filtración (m^2).

μ^* : velocidad de crecimiento específica resultante (h^{-1}).

Balance de sustrato:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= D(S_0 - S) - \frac{\mu X}{Y_{XS}} = 0 \\ D(S_0 - S) &= \frac{\mu X}{Y_{XS}} \end{aligned} \quad (14)$$

Balance de producto:

$$DP = \mu XY_{PX} \quad (15)$$

Finalmente, el rendimiento biomasa/sustrato definido para este sistema quedó como:

$$Y_{XS} = \frac{X \left(\frac{\alpha}{D} + \theta \right)}{S_0 - S} \quad (16)$$

La productividad del cultivo en perfusión (g/Lh) se define haciendo el mismo razonamiento que en el cultivo continuo [1], pues se llega a la productividad de células para este sistema:

$$p = \theta DX \quad (17)$$

y la productividad para el producto:

$$p = PD \quad (18)$$

Durante todo el razonamiento de las ecuaciones cinéticas no se han tenido en cuenta la influencia de la velocidad de giro del filtro rotatorio ni el área del filtro rotatorio [6-8], ni los esfuerzos cortantes que actúan sobre las células [9, 10]:

$$V_c = \frac{F}{s} = \frac{F}{\varepsilon A} \quad (19)$$

Donde:

V_c : velocidad centrífuga (m/s).

s : área disponible total para el paso de células a través de la membrana (m^2).

ε : porosidad de la membrana.

$$Vg = \theta r s \quad (20)$$

Donde:

Vg : velocidad de sedimentación (m/s).

θ : factor de conversión de g/h a m/s.

r : flujo de sedimentación (g/h).

Modelación estadística de θ

Se tomaron varias corridas, se calculó θ para graficarlo contra el tiempo de las corridas (Figura 3) y se le ajustó un polinomio.

8. Yashwant MD, Mina DM, Renato F. Practical consideration in operation and scale-up of spinfilter based bioreactors for monoclonal antibody production. *Biotechnol Prog* 1996;12:57-64.

9. Favre E, Thaler T. An engineering analysis of rotating sieves for hybridoma cell retention in stirred tank bioreactors. *Cytotechnology* 1992;12:180-7.

10. Varecka R, Scheirer W. Use of rotating wire cage for retention of animal cells in a perfusion fermentor. *Develop Biologic Standard* 1987;66:269-72.

Así se demostró que el factor de paso de células a través de la malla (θ) al inicio de la perfusión, partió de un valor máximo, y fue disminuyendo con el tiempo, como se ha descrito en la literatura [3].

Simulación

A partir de los balances anteriores se llegó a las ecuaciones que describen el comportamiento del biorreactor de 41 L:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{MAX} X - \theta DX \tag{5}$$

$$\frac{dP}{dt} = qpX - DP \tag{11a}$$

Donde:

qp : velocidad de consumo (g/h).

$$\frac{dMp}{dt} = VD \tag{21}$$

Donde:

Mp : masa de volumen acumulado (L/h)

$$\frac{dAcMam}{dt} = VDP \tag{22}$$

Donde:

$AcMan$: concentración de anticuerpo (g/L)

Y el comportamiento de la variable θ fue:

- Para 30 L

$$\theta = (0.8778195) + (-0.006877774) * \text{tiempo} + (2.239901e-5) * \text{tiempo}^2 + (-3.033904e-8) * \text{tiempo}^3 \tag{23}$$

- Para las corridas del año 2000

$\mu = 0.03$ para $X_v \leq X_v \text{ máx}$ (7.68×10^6 células/mL), donde X_v es concentración celular y $X_v \text{ máx}$, la concentración celular máxima.

$\mu = 0.005$ para $X_v \geq X_v \text{ máx}$

- Para las corridas del año 2001

$\mu = 0.035$ para $X_v \leq X_v \text{ máx} = 24 \times 10^6$ células/mL

$\mu = 0.005$ para $X_v \geq X_v \text{ máx}$

En el VisSim se programaron las ecuaciones de los modelos, y se obtuvo el comportamiento de las curvas de crecimiento celular, de la concentración de AcM, del producto acumulado y del medio perfundido, bajo la influencia de las variables: concentración celular inicial, concentración celular máxima, velocidad específica de crecimiento celular máxima, velocidad específica de crecimiento celular mínima, y velocidad específica de formación de producto.

Comportamiento de los valores reales y simulados de las corridas de los años 2000 y 2001

La simulación de las corridas del año 2000 se hizo bajo las siguientes condiciones: concentración celular inicial (X_{v0}) de 2×10^5 células/mL, concentración celular máxima ($X_v \text{ máx}$) de 7.68×10^6 células/mL, velocidad específica de crecimiento celular máxima ($\mu \text{ máx}$) de 0.03 h^{-1} , velocidad específica de crecimiento celular mínima ($\mu \text{ min}$) de 0.005 h^{-1} , velocidad específica de formación de producto (qp) de $5 \times 10^{-7} \mu\text{g}/(10^6 \text{ células} \cdot \text{h})$; utilizando el modelo de θ para 30 L.

Con el objetivo de demostrar la eficiencia del modelo utilizado, se compararon los datos reales con los obtenidos en la simulación (Figuras 4 y 5); y se llegó a las conclusiones siguientes.

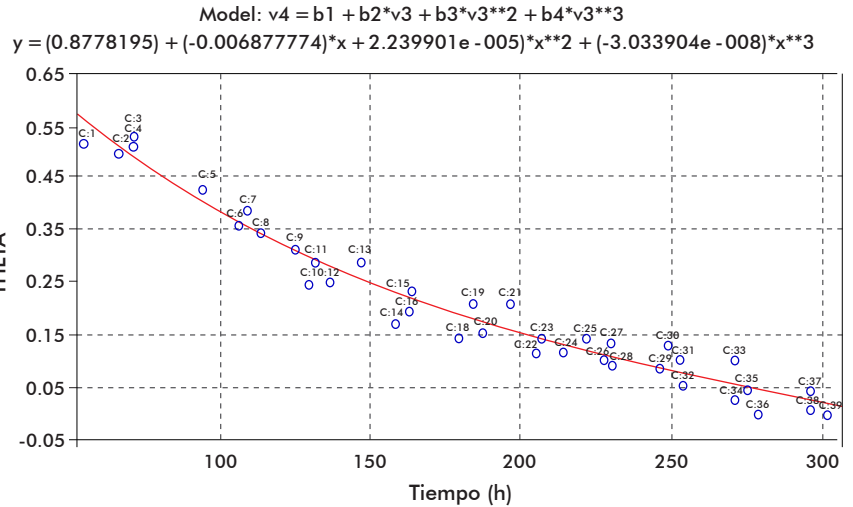


Figura 3. Comportamiento del polinomio ajustado para θ en el tiempo.

Tabla 1. Valores de los coeficientes del polinomio de θ para fermentadores de 30 L

Estimación estadística no-lineal	Modelo: $v4 = b1 + b2*v3 + b3*v3**2 + b4*v3**3$ Variable: Theta Ajuste final: 0.033814766	Ajuste: (OBS - PRED)**2 R = 0.98216	Análisis de varianza: 96.464%	
N = 41	B1	B2	B3	B4
Estimado	0.87782	-0.00688	0.000022	0.00000
Error estándar	0.06625	0.0013	0.000008	0.00000
t (24)	13.24919	-5.28021	2.911095	-2.1796
P: nivel	0.00000	0.00001	0.00607	0.03573

Comparando los valores obtenidos en la simulación y los datos reales del año 2000, se demuestra que el modelo utilizado describe el comportamiento de las variables hasta el momento en que las células comienzan a morir. El comportamiento de la curva de crecimiento simulada al final de la fermentación, se debe a que el modelo no representa la fase de muerte celular, por lo que al aumentar la retención del filtro, las células comienzan a crecer exponencialmente. La

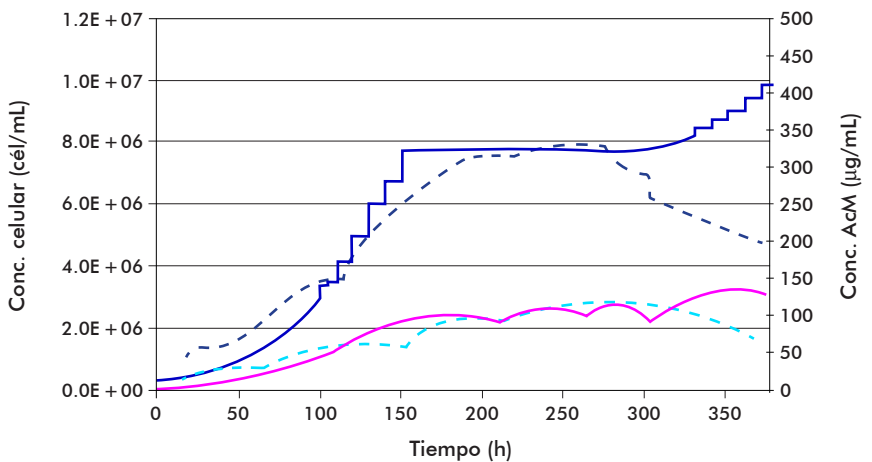


Figura 4. Comparación de los parámetros obtenidos a partir de la simulación y los datos reales para la concentración celular y concentración de AcM, año 2000. (—) X_v simulada; (- -) X_v real; (—) AcM simulado; (- -) AcM real.

diferencia entre las curvas de crecimiento en el periodo de inicio de la corrida hasta las 100 horas, se puede justificar por la concentración celular que se inoculó al biorreactor. Como la concentración celular real es mayor que la impuesta en la simulación, no representa la fase de muerte, por lo que al aumentar la retención del filtro, las células comienzan a crecer exponencialmente, como se demuestra en otros trabajos [6, 11-15].

Teniendo en cuenta las pendientes de las curvas, se puede decir que el modelo simulado crece con una mayor velocidad de crecimiento específica.

Para la simulación de las corridas del año 2001 se utilizaron las condiciones: concentración celular inicial (X_{V_0}) de 2×10^5 células/mL, concentración celular máxima (X_V máx) de 24×10^6 células/mL, velocidad específica de crecimiento celular máxima (μ máx) de 0.035 h^{-1} , velocidad específica de crecimiento celular mínima (μ mín) de 0.005 h^{-1} y velocidad específica de formación de producto (qp) de $5 \times 10^{-7} \mu\text{g}/(10^6 \text{ células} \cdot \text{h})$, utilizando el modelo de *theta* para 30 L.

En igual estudio que el anterior, pero para las corridas del 2001 (Figuras 6 y 7), se comparó la curva de datos reales y la que se obtuvo en la simulación, y se llegó a la conclusión de que existe una marcada diferencia en la velocidad de crecimiento específica. Evidentemente se demuestra la gran influencia de la velocidad de muerte específica en los procesos cinéticos, por lo que se hace necesario tener un valor numérico seguro de esta variable, para un ajuste más preciso del modelo obtenido y lo que en la realidad se va obteniendo, como se describe en la literatura [6, 11-15]. Esto repercute en la concentración del anticuerpo producido, y por lo tanto, en el acumulado, lo cual no ocurre con el medio perfundido, que se mantiene constante.

Limitaciones

El modelo no tiene en cuenta la influencia de la velocidad de giro del filtro rotatorio, ni de la razón: área de filtración por volumen del fermentador. Tampoco considera la influencia de los fenómenos hidrodinámicos sobre el cultivo. Con respecto al factor de restricción de paso de células a través de la membrana del filtro rotatorio, se le ajustó un polinomio estadístico y no fenomenológico. No se hizo el balance del consumo de oxígeno del cultivo.

Conclusiones

Con la identificación de las ecuaciones matemáticas para la descripción del comportamiento celular en los fermentadores en perfusión, con el ajuste del modelo estadístico que describe el factor de paso de las células a través de la malla del filtro rotatorio en el biorreactor de 30 L, se conformó un módulo en el programa VisSim que permitió simular la operación de fermentación, por el cual se determinó que las variables influyen marcadamente en el sistema de perfusión. Comparando los valores obtenidos en la simulación y los datos reales del año 2000, se demostró que el modelo utilizado describe el comportamiento de las variables hasta el momento en que las células comienzan a morir. El comportamiento de la curva de crecimiento simulada al final de la fermentación se debe a que el modelo no representa la fase de muerte, por lo que al aumentar la retención del filtro, las células

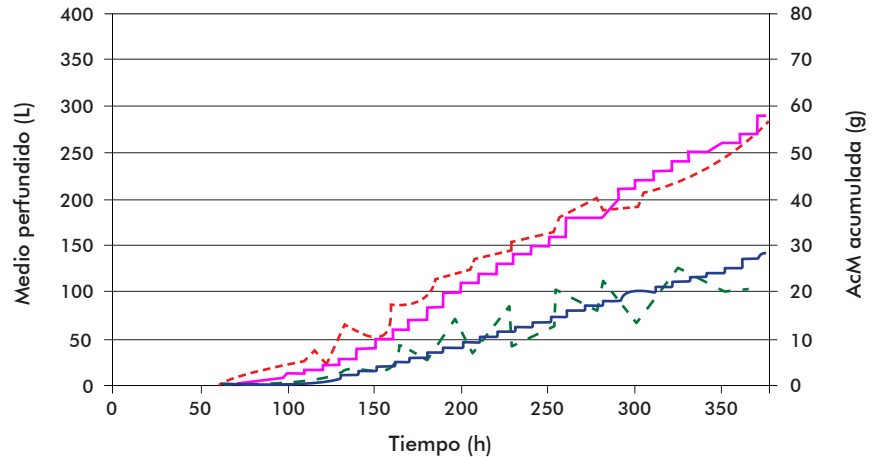


Figura 5. Comparación de los parámetros obtenidos a partir de la simulación y los datos reales para medio perfundido y producto acumulado, año 2000. (—■—) Medio perfundido simulado; (---▲---) Medio perfundido real; (—▲—) AcM acumulado simulado; (---▲---) AcM acumulado real.

comienzan a crecer exponencialmente. La diferencia de las curvas de crecimiento en el periodo de inicio de la corrida hasta las 100 horas, se puede justificar por

11. Reuss M, Baltes M, Schneider R, Sturm C. Optimal experimental design for parameter estimation in unstructured growth models. *Biotechnol Prog* 1994;10:480-8.

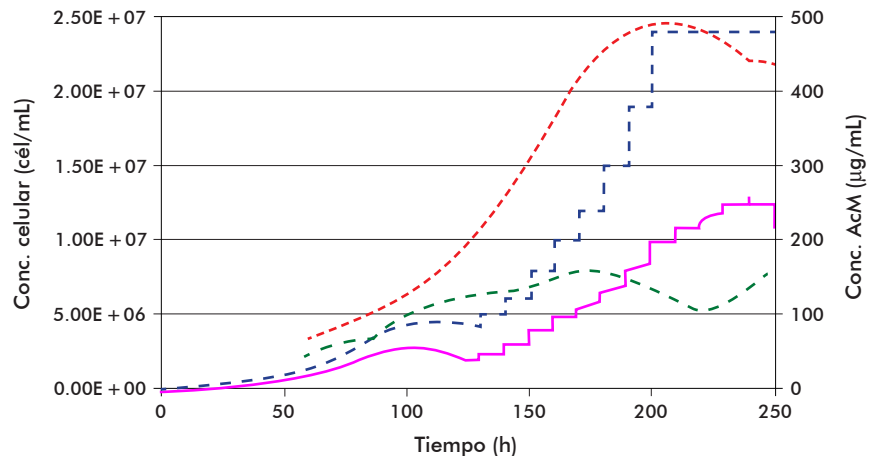


Figura 6. Comparación de los parámetros obtenidos a partir de la simulación y los datos reales para la concentración celular y concentración de AcM, año 2001. (---▲---) X_V simulada; (---▲---) X_V real; (—■—) AcM simulado; (---▲---) AcM real.

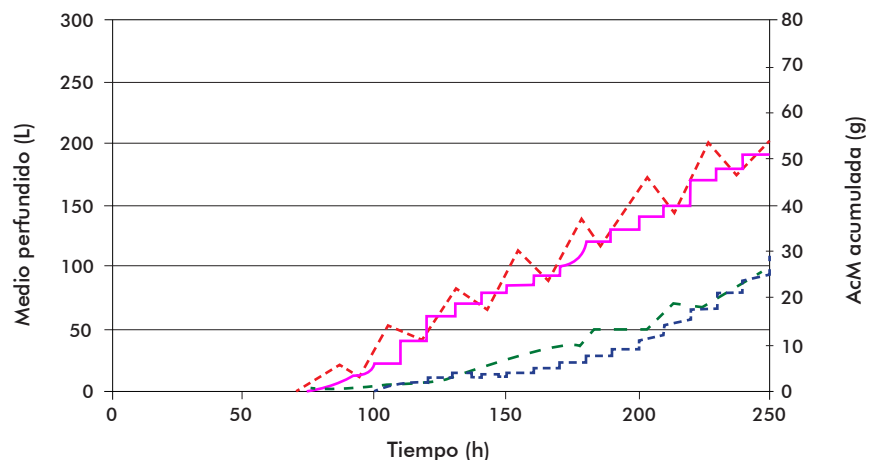


Figura 7. Comparación de los parámetros obtenidos a partir de la simulación y los datos reales para medio perfundido y producto acumulado, año 2001. (—■—) Medio perfundido simulado; (---▲---) Medio perfundido real; (—▲—) AcM acumulado simulado; (---▲---) AcM acumulado real.

la concentración celular que se inoculó al biorreactor, donde la concentración celular real es mayor que la impuesta en la simulación. Se hizo un análisis similar con las corridas del 2001, y al comparar la curva de datos reales y la que se obtuvo en la simulación, se llegó a la conclusión de que hay una marcada diferencia en la velocidad de crecimiento específica. Evidentemente la velocidad de muerte específica influye en los

procesos cinéticos, por lo que se hace necesario tener un valor numérico seguro de esta variable, para un ajuste más preciso del modelo obtenido y lo que se va obteniendo en la realidad, como se demuestra en la literatura [6, 11-15]. Esto repercute en la concentración del anticuerpo producido y, por lo tanto, en el acumulado, lo cual no ocurre con el medio perfundido, que se mantiene constante.

12. Ryu DY. Cell cycle kinetics and monoclonal antibody productivity of hybridoma cells during perfusion culture. *Biotechnol Bioeng* 1994;44:361-7.

13. Zeng AP, Deckwer WD. Model simulation and analysis perfusion culture of mamma-

lian cell density. *Biotechnol Prog* 1999;15:373-82.

14. Dutton RL, Schare JM, Moo-Young M. Descriptive parameter evaluation in mam-

malian cell culture. *Cytotechnology* 1998;26:139-52.

15. Haas CN. Unified Kinetic treatment for growth on dual nutrients. *Biotechnol Bioeng* 1994;44:154-64.

Recibido en agosto de 2008. Aprobado en agosto de 2009.