



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNO-
LOGÍA Y MATERIALES

CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES OBTENIDAS DE
TEJIDO ADIPOSEO PARA TERAPIA CELULAR

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

LORNA VALENCIA LEÓN PARDO

PROFESOR GUÍA:
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE
PABLO CAVIEDES FERNÁNDEZ

SANTIAGO DE CHILE
2019

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: LORNA VALENCIA LEÓN PARDO
FECHA: 2019
PROF. GUÍA: ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES OBTENIDAS DE TEJIDO ADIPOSO PARA TERAPIA CELULAR

La terapia celular ha sido presentada en los últimos años como una vía prometedora para tratar varias enfermedades. En este contexto, las células madre parecen ser la población ideal, debido a su capacidad de autorenovación y diferenciación a múltiples tipos celulares. La grasa, es uno de los tejidos más abundantes del ser humano, contiene una cantidad significativa de células madre y es fácilmente accesible mediante lipoaspirado. Tradicionalmente, las células madre derivadas de tejido adiposo (hASC) proliferan y se diferencian mediante técnicas de cultivo adherente, por lo que el escalamiento se basa en aumentar la superficie de crecimiento o el número de placas de cultivo. Sin embargo, estos métodos son laboriosos, costosos y susceptibles a la contaminación. Por otro lado, el cultivo en 3 dimensiones ofrece una opción fácilmente escalable, con la que se puede generar grandes cantidades de células en poco tiempo, pero aún no existe un protocolo establecido para llevar estas células a suspensión.

El objetivo general es encontrar una metodología para adaptar las células hASC al crecimiento en suspensión y así diseñar una estrategia de escalamiento para el cultivo, manteniendo el potencial de diferenciación y las características fenotípicas de las células madre. Para estos, las células se caracterizaron en cuanto a su crecimiento y estado metabólico, para luego testear 5 medios de cultivo, variando el medio basal, la concentración de glucosa y la disponibilidad antioxidantes. El medio de cultivo con mejor desempeño, se utilizó para llevar las células a suspensión. Adicionalmente, se probaron alternativas *xeno-free* al suero fetal bovino, medios libre de calcio y tolerancia a surfactantes. Para el cultivo 3D, se evaluó el potencial de crecimiento en esferoides y en dos tipos de microcarrier comerciales, SoloHill y Cytodex 3. El cultivo resultante fue evaluado para verificar las características fenotípicas y la capacidad de diferenciación.

Los mejores parámetros en cultivo adherente fueron logrados con el medio *a*-MEM con antioxidantes; se alcanzó una concentración máxima $0,38 \cdot 10^6$ [cel/ml], un tiempo de duplicación de 23 horas y un $\Delta L/\Delta G = 1,21$. Al llevar las células a suspensión, estas no fueron capaces de proliferar en esferoides, pero sí en microcarriers lo que indica que son dependientes de anclaje. El cultivo en Cytodex 3 logró una biomasa total de $0,37 \cdot 10^6$ [cel/ml], un 50 % más que el cultivo en SoloHill. Sin embargo, en ambos casos los parámetros de crecimiento no se mantuvieron respecto al cultivo adherente. Las células cosechadas, conservaron sus propiedades adherentes, los marcadores fenotípicos y su capacidad de diferenciación. El lisado de plaquetas humano demostró ser una alternativa *xeno-free* al suero bovino fetal, pero se debe estudiar su comportamiento en el cultivos en suspensión.

Este estudio permitió establecer un medio de cultivo adecuado para la proliferación de las células hASC, mejorando significativamente los parámetros de cultivo. Además, se adaptó su crecimiento a suspensión mediante el uso de microcarriers, de manera que se tiene un sistema escalable y que podría proporcionar suficientes células para terapia celular.

A mi mamá y Abner, por siempre creer en mí

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. <i>Adipose-derived stem cells</i>	2
2. Objetivos y limitaciones	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
2.3. Limitaciones	4
3. Marco teórico	6
3.1. Expansión	6
3.1.1. Cultivo en esferoides	7
3.1.2. Métodos para la generación de esferoides	8
3.1.3. Cultivo en microcarrier	9
3.2. Composición del cultivo	10
3.2.1. Medios de cultivos	10
3.2.2. Calcio	11
3.2.3. Glucosa	11
3.2.4. Suero	12
3.2.5. Antioxidantes	12
3.2.6. Surfactantes	14
4. Materiales y métodos	15
4.1. Materiales	15
4.1.1. Reactivos	15
4.1.2. Equipos	16
4.1.3. Material de laboratorio	16
4.2. Obtención células	16
4.3. Cultivo celular adherente y banco de células	17
4.4. Cultivo en suspensión	17
4.4.1. Cultivo en esferoides	17
4.4.2. Cultivo en microcarrier	17
4.4.3. Cosecha	18
4.5. Caracterización del cultivo	18
4.5.1. Curva de crecimiento adherente	18
4.5.2. Curva de crecimiento en suspensión.	18
4.5.3. Tasas Específicas de Consumo/Producción	18

4.5.4.	Potencial de diferenciación	19
4.5.5.	Citometría de flujo	19
4.6.	Diseño experimental	20
4.6.1.	Cultivo adherente	20
4.6.2.	Cultivo en suspensión	21
5.	Resultados y discusión	22
5.1.	Cultivo adherente	22
5.1.1.	Medio de cultivo basal	22
5.1.2.	Suplementos	28
5.2.	Cultivo en suspensión	30
5.2.1.	Medio libre de calcio	30
5.2.2.	Surfactantes	31
5.2.3.	Cultivo en esferoides	32
5.2.4.	Cultivo en microcarrier	33
5.3.	Propuesta de escalamiento	38
	Conclusión	40
	Bibliografía	41
	Anexos	48
.1.	Composición medios de cultivo	48
.2.	Citometría de flujo	50

Índice de Tablas

3.1. Característica de microcarriers comerciales [28-30]	10
3.2. Concentración de glucosa medios de cultivos (Gibco)	12
4.1. Ensayo de diferenciación a linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico	20
5.1. Parámetro de cultivos para distintos medios basales	22
5.2. Expresión de marcadores de superficie en células hASC expandidas en cultivo adherente con α -MEM AntiOX	28
5.3. Parámetros de cultivo para cultivo en FBS y hPL	28
5.4. Concentración final de células para cultivo de hASC para distintas concentraciones de surfactantes	31
5.5. Parámetros de cultivo para crecimiento en microcarriers	34
5.6. Expresión de marcadores de superficie en células hASC expandidas en microcarriers	38
7. Composición medios de cultivo DMEM, DMEM/F12 y α - MEM (Gibco)	48
7. Composición medios de cultivo DMEM, DMEM/F12 y α - MEM (Gibco)	49

Índice de Ilustraciones

3.1. Escalamiento cultivo adherente (adaptación) [20]	6
3.2. Esquema de formación de esferoide multicelular (adaptación) [22]	7
3.3. Estructura de esferoide multicelular (adaptación) [22]	7
3.4. Métodos para la generación de esferoides (adaptación) [25]	8
3.5. Ruta metabólica de la glucosa en células mesenquimales obtenidas desde tejido adiposo (adaptación) [45]	13
5.1. Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en DMEM/F12 baja glucosa. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato	23
5.2. Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en DMEM/F12 alta glucosa. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato	24
5.3. Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en DMEM baja glucosa. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato	24
5.4. Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en α -MEM baja glucosa. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato	26
5.5. Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en DMEM bajo glucosa con antioxidantes. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato	27
5.6. Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en 10 % suero bovino fetal (FBS) y 5 % lisado de plaquetas humano (hPL) a) Densidad celular y viabilidad 10 % FBS. b) Consumo de glucosa y producción de lactato 10 % FBS.c) Densidad celular y viabilidad 5 % hPL. d) Consumo de glucosa y producción de lactato 5 % hPL	29
5.7. Curva de crecimiento para cultivo en α -MEM quelado con 2 mM de EGTA a) Cultivo en placa adherente b) Cultivo en placas no adherentes	30
5.8. Comparación de la evolución del cultivo en α -MEM y quelado con 2 mM de EGTA en placas adherente y no adherentes	31
5.9. Seguimiento del avance del cultivo en esferoides a) 24 horas b) 72 horas c) 120 horas	32
5.10. Curva de crecimiento para cultivo en esferoides	33

5.11. Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo en suspensión en SoloHill microcarrier. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato	34
5.12. Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo en suspensión en Cytodex 3 microcarrier. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato	35
5.13. Seguimiento del avance del cultivo en SoloHill y Cytodex 3 microcarriers . .	36
5.14. Recuperación celular para tratamiento con colagenasa tipo I y TrypLE . . .	37
5.15. Ensayo de diferenciación a) Adipogénico, b) Condrogénico, c) Osteogénico, d) - f) Controles	37
16. Histograma de citometría de flujo para cultivo en microcarrier Cytodex 3 . .	50
17. Histograma de citometría de flujo para cultivo adherente en α -MEM AntiOX	51

Capítulo 1

Introducción

Durante la última década, la terapia celular se ha planteado como una alternativa con gran potencial terapéutico para regenerar o reparar tejidos dañados, ya que diferencia de los tratamientos convencionales, utiliza células como principio activo, las cuales pueden migrar, proliferar, diferenciarse y responder a su entorno. La terapia celular implica el trasplante de células vivas, las cuales pueden provenir del mismo paciente (autólogo) o de un donante compatible, con o sin parentesco con el paciente (alógeno) [1]. Actualmente existe un amplio campo de investigación en torno a trastornos no tratables con productos farmacéuticos disponibles y enfermedades que actualmente son crónicas o incurables, de modo que a la fecha la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado 16 productos de uso clínico [2].

En este contexto, se ha estudiado la actividad terapéutica de distintas variedades de células, dentro de las cuales las células madre representan uno de los tipos más interesantes. Estas células se encuentran presentes en los seres humanos durante toda su vida y funcionan como una reserva natural, que da origen a las poblaciones de células especializadas que son incapaces de realizar copias de sí mismas mediante división celular. Se encuentran indiferenciadas y presentan una serie de propiedades esenciales en la regeneración de tejidos y órganos, tales como, la capacidad de autorenovarse, migrar hacia los tejidos dañados, diferenciarse a distintos linajes celulares y modular la respuesta inmune [3, 4].

Por supuesto, existen distintos tipos de células madre y dependiendo de su procedencia se pueden clasificar en 3 categorías [3, 5, 6]:

- **Células madres embrionarias (hESC).** Derivan de las primeras etapas del desarrollo embrionario y pueden generar cualquier tipo de célula, tejido u órgano del cuerpo, por lo que se les considera totipotenciales. Su uso está limitado por las consideraciones éticas, ya que la obtención de este tipo de células requiere la destrucción de embriones humanos.
- **Células madre pluripotentes inducidas (iPSC).** Son células somáticas reprogramadas por medio de ingeniería genética, para imitar la expresión de genes y factores propios de las células madre embrionarias. Fuera de su nicho nativo, existe el riesgo de proliferación y diferenciación descontroladas, motivo por el cual su uso en medicina

regenerativa aún se encuentra restringido.

- **Células madre mesenquimales (MSC).** Son poblaciones de células que se encuentra en el cordón umbilical y en múltiples tejidos adultos, como la médula osea y la grasa. A diferencia de los dos tipos anteriores, son capaces de producir un rango limitado de linajes de células de acuerdo a su localización, por lo que se les considera multipotentes. Se ha demostrado que pueden diferenciarse *in vitro* o *in vivo* a células especializadas que se encuentran en el tejido esquelético, como grasa (adipocitos), cartílago (condrocitos), hueso (osteocito) y otros tipos celulares.

En los últimos años, se han reportados múltiples métodos de aislamiento, proliferación y caracterización de las células mesenquimales, las cuales además pueden presentar diferencias entre sí, dependiendo del tejido de procedencia. Por esta razón, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) en el año 2006 estableció criterios mínimos para definir a las células mesenquimales humanas, tanto para investigaciones científicas, como para estudios pre-clínicos. Primero, deben ser adherentes bajo condiciones estándar de cultivo celular. Segundo, un 95 % de la población debe expresar los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, y menos de un 5 % debe presentar ausencia de marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD19 y HLA-DR. Finalmente, deben ser capaces de diferenciarse en los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico, en ensayo *in vitro* [7].

1.1. *Adipose-derived stem cells*

Durante muchos años las células mesenquimales derivadas de médula osea, fueron la principal fuente de células madre en medicina regenerativa. Sin embargo, para su obtención se requiere de un procedimiento de aspirado altamente invasivo, el cual presenta un bajo rendimiento en la recuperación, junto con una disminución en el potencial de proliferación y diferenciación como consecuencia de la senescencia [8, 9].

El tejido adiposo es uno de los más abundantes en el ser humano; constituye aproximadamente el 20 % del peso corporal y se encuentra ampliamente distribuido por distintas zonas del organismo [10]. Las células mesenquimales obtenidas desde la grasa se denominan ASC o *adipose-derived stem cells* y representan 0,5 %-5 % del total tejido [11, 12]. Comúnmente residen en la fracción vascular estromal de tejido adiposo, adheridas en las paredes de los vasos sanguíneos donde reciben señales para diferenciarse en adipocitos maduros [13].

La liposucción es de las cirugías más realizadas en el mundo y a pesar de que su objetivo original es meramente estético, hoy en día puede establecerse como la manera ideal de obtener hASC, ya que es barato, poco invasivo y entrega un mayor rendimiento que el aspirado de médula ósea [12, 14]. En una intervención se pueden obtener hasta 200 gramo de tejido y en 1 gramo de tejido adiposo puede contener entre $5 \cdot 10^3$ a $2 \cdot 10^5$, aproximadamente 500 veces más que 1 gramo de médula ósea [15]. Estas diferencias pueden ser causadas por las características de los donantes; tales como género, edad, IMC, historial médico y también el tipo de tejido adiposo, su localización y el método de recolección de tejidos [14].

Si bien las terapias en base a células madre aún se encuentran en desarrollo, se han logrado ensayos clínicos exitosos, por ejemplo en el trasplante de células en pacientes con isquemia miocárdica, en el tratamiento de lesiones en la médula espinal o la regeneración células pancreáticas para tratar la diabetes insulino dependiente. En estos casos, se necesitan $1 - 10 \cdot 10^9$ células por dosis para lograr un efecto terapéutico relevante [16]. Sin embargo, en promedio se pueden aislar $1 \cdot 10^7$ células mesenquimales desde 300 mL de lipoaspirado [17], por lo que alcanzar dicha cantidad de células es uno de los principales desafíos.

Capítulo 2

Objetivos y limitaciones

2.1. Objetivo general

Este trabajo tiene como objetivo estudiar distintas metodologías para adaptar el crecimiento de células madre mesenquimales extraídas de tejido adiposo, a cultivo en suspensión. De este modo, se busca la optimizar de las condiciones de cultivo, para así diseñar sistema escalable, manteniendo las características fenotípicas y la capacidad de diferenciación de las células.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el crecimiento y metabolismo de las células hASC en condiciones de cultivo adherente.
- Evaluar alternativas de medios de cultivo, suplementos y tolerancia a surfactantes.
- Determinar potencial de crecimiento de las células en esferoides y microcarrier para optimizar la producción de biomasa.
- Estudiar el crecimiento y metabolismo de las células hASC en cultivo en suspensión.
- Verificar que las células mantienen la capacidad de diferenciación y que expresan los marcadores fenotípicos clásicos para hASC.

2.3. Limitaciones

Si bien este trabajo busca proliferar células mesenquimales para ser utilizadas en terapia celular, no se evaluará el potencial terapéutico, ni se realizarán ensayos clínicos. Únicamente se verificará que las células cumplan con los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Así mismo, solo se utilizarán células obtenidas desde tejido adiposo y no se comparan con células mesenquimales obtenidas desde otro tipo de tejidos.

Se hará una generalización de la población de células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo, basándose en que todos los donantes poseen antecedentes médicos similares. Dicho esto, no se evaluará la replicabilidad de los resultados para las muestras de distintos pacientes.

El metabolismo de las células será caracterizado en base a la medición de lactato y glucosa extracelular. No se cuantificará ningún otro metabolito y no se estudiarán los flujos intracelulares, por lo que no se propondrá ningún modelo para análisis de flujo metabólico.

Capítulo 3

Marco teórico

3.1. Expansión

Tradicionalmente las *stem cells* son mantenidas y expandidas por medio de cultivo 2D en placas adherentes. El escalamiento se reduce al aumento de la superficie de trabajo o del número de placas, tal como se muestra en la Figura 3.1. Este procedimiento no es apropiado a nivel clínico, ya que se vuelve laborioso, costoso y altamente susceptible a la contaminación, producto del gran número de unidades que se deben manipular [18]. Por otra parte, los cultivos adherentes de MSC pueden alterar sus propiedades fenotípicas y terapéuticas, ya que el entorno del cultivos es diferentes a las condiciones fisiológicas a las que se encuentra sometido naturalmente [19].

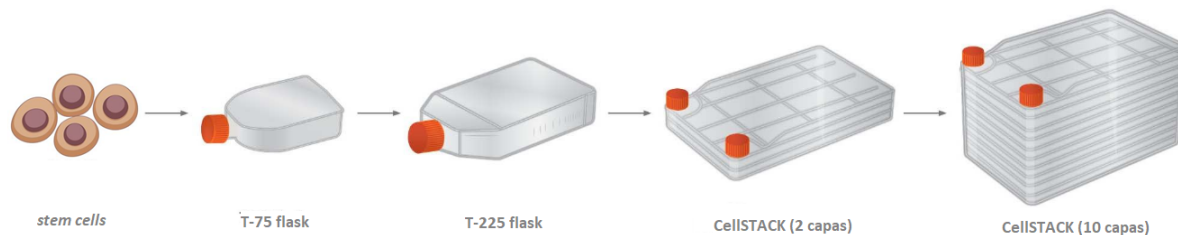


Figura 3.1: Escalamiento cultivo adherente (adaptación) [20]

Los cultivos en 3 dimensiones son ampliamente utilizados para obtener de forma eficiente grandes cantidades de biomasa. Este tipo de sistemas permite crear ambientes homogéneos, ya que controla la formación de agregados celulares, distribuye de forma equitativa los componentes del medio y mejora la transferencia de gases y nutrientes dentro de las células, favoreciendo el desarrollo del cultivo [19, 21]. No obstante, a pesar de que existe una amplia gama de bioreactores, aún no existe un procedimiento estandarizado para el cultivo en suspensión de este tipo de células.

3.1.1. Cultivo en esferoides

Algunos tipos celulares crecen naturalmente en suspensión, sin embargo, en la mayoría de los casos las células deben ser adaptadas para sobrevivir bajo estas condiciones. Uno de los métodos más simple, es a través de la formación de agregados celular o esferoides. Esta estructura multicelular, se generan por la interacción espontánea de la matriz extra celular (ECM) de las células, dando paso a una estructura compacta, tal como se muestra en la Figura 3.2 [22].

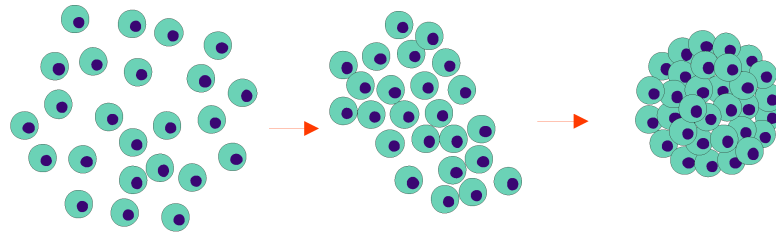


Figura 3.2: Esquema de formación de esferoide multicelular (adaptación) [22]

Debido a su estructura, las células que componen el esferoides se encuentran expuestas heterogeneamente a la transferencia de nutrientes, oxígeno y desechos, lo que además se encuentra directamente con el tamaño del agregado. En la Figura 3.3 se muestran las tres capas básicas de un esferoide; la capa exterior con células metabólicamente activas; la capa intermedia compuesta por células en estado estacionario (reposo) con menor tasa metabólica, junto a una baja exposición a nutrientes y finalmente la capa interna o núcleo, que presenta células necróticas producto de la insuficiencia de nutrientes y la acumulación de desechos. Aquí radica la importancia de formar agregados pequeños y uniformes, de manera de mantener al óptimo la función biológica de las células [23, 24].

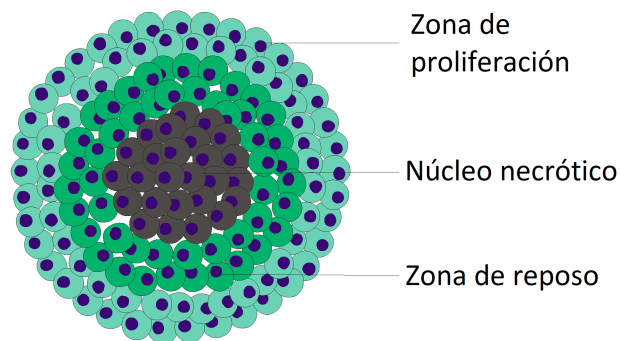


Figura 3.3: Estructura de esferoide multicelular (adaptación) [22]

3.1.2. Métodos para la generación de esferoides

Actualmente existe una amplia gama de técnicas para la formación de agregados multicelulares, los cuales se basan en el uso de espacios cerrados o fuerzas mecánicas, para aumentar la interacción entre células (Figura 3.4). El criterio general para escoger un método u otro dependerá de la eficiencia de producción, la homogeneidad de los esferoides y los posibles cambios o daños en la fisiología de la célula [19, 25].

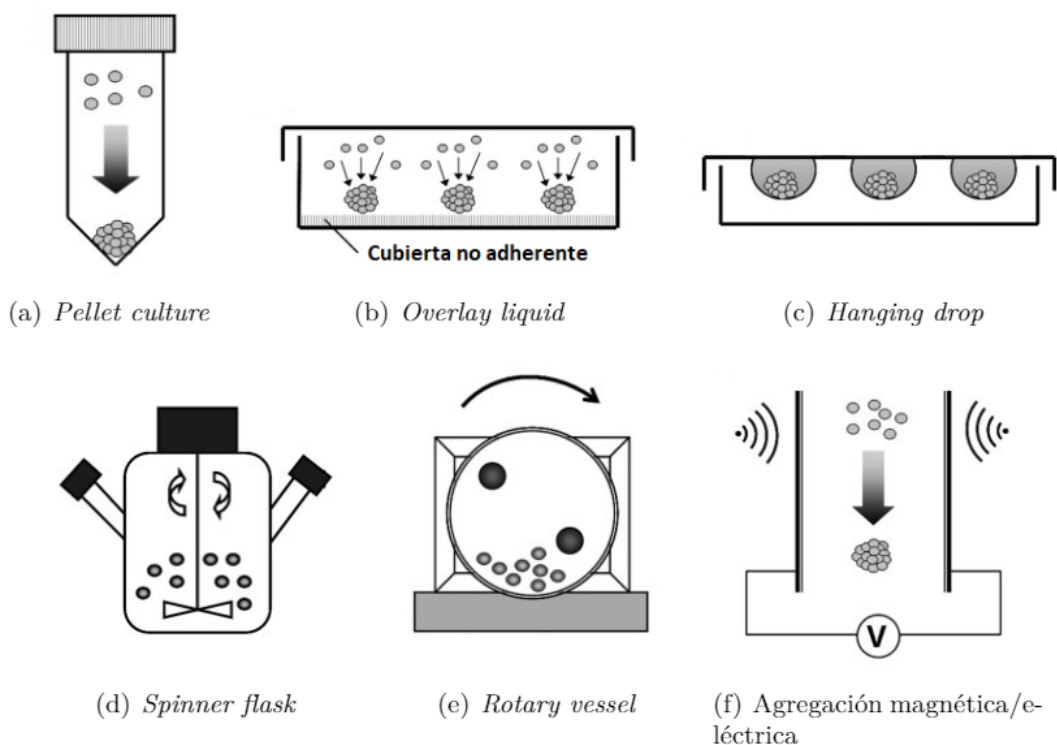


Figura 3.4: Métodos para la generación de esferoides (adaptación) [25]

Pellet culture: Este método se basa en el uso de fuerza centrífuga para maximizar el contacto entre células, generando de manera fácil y rápida agregados de gran tamaño. Esta es una de sus principales desventajas, ya que los esfuerzos de corte pueden dañar las células. Por otra parte, esta técnica no es escalable y los esferoides generados no pueden ser utilizados con fines terapéuticos, ya que poseen núcleos necróticos debido a la gran cantidad de células.

Placas no adherentes (*liquid overlay*): En esta técnica se impide la adherencia de las células a las placas de cultivo, ya sea recubriendo su superficie con algún polímero hidrofóbico (agarosa o pHEMA) o utilizando placas de no adherentes. En algunos casos, después del sembrado se aplican vibraciones de baja magnitud para promover la agregación celular. Si bien este método es simple, se obtienen esferoides diversos en tamaño y forma. Esto puede ser controlado utilizando placas de 96 pocillos, pero se ve comprometido el escalamiento.

Hangin drop: El método de *hangin drop* forma esferoides a través de la agregación espontánea por acción de la gravedad. En una tapa se depositan gotas entre 15 - 30 μL , con una densidad celular definida (300 a 3000 células). Al voltear la tapa, las gotas son retenidas por efecto de la tensión superficial, concentrando las células en el fondo y formando el agregado. Es particularmente útil en estudios farmacológicos y tumorales, debido a que se pueden generar esferoides de tamaño y composición definida. No obstante, este procedimiento es bastante laborioso, lo que dificulta su producción masiva.

Spinner flask: Un *spinner* es un tipo de bioreactor en el que el cultivo es constantemente mezclado por un agitador magnético. Esto, promueve la interacción entre las células y la transferencia de masa, por lo que es ideal para cultivos prolongados y para la producción de una gran cantidad de esferoides (escalabilidad). En general este tipo de enfoque no es recomendable para células de baja adhesión, ya que los esfuerzos de corte pueden dañar las células. Si bien no se obtiene una distribución uniforme en el tamaño de los esferoides, esto se puede regular controlando la velocidad de agitación.

Rotary vessel: *Rotating vessels* es un sistema de cultivo similar al *spinner flask*, pero en vez de agitar, el recipiente rota sobre si mismo para mantener las células en suspensión. De esta forma, se crea un microambiente adecuado, sin esfuerzos de corte, idóneo para cultivos de larga duración.

Agregación magnética/eléctrica: Esta técnica induce la formación de esferoides a través de campos eléctricos, magnéticos o ultrasonido. En general, la agregación es inespecífica, de manera que se obtiene un bajo rendimiento y control sobre el tamaño y la forma de los agregados. Es tipo de estímulo genera estrés en las células, dañando su fisiología, pero hasta el momento no sus efectos no han sido concluyentes.

3.1.3. Cultivo en microcarrier

Los microcarriers son esferas pequeñas, de diámetro variable entre 100 - 300 μm , las cuales proveen una superficie adherente para las células dependientes de anclaje en los cultivos en agitados [26]. Los microcarriers logran combinar los cultivos en monocapa con los beneficios del cultivo en suspensión, pues aumenta la relación área/superficie del cultivo y la exposición a un ambiente homogéneo. Así mismo, al ser un cultivo de 3 dimensiones optimiza la proliferación celular y el proceso de escalamiento, reduciendo el riesgo de contaminación y los costos de operación [27].

En el mercado existe una amplia gama de microcarriers disponibles para el cultivo de distintos tipos de células. En términos generales, estos se pueden clasificar en 3 categorías: microporosos, macroporosos y no porosos, cuya matriz de soporte puede estar hecha de poliestireno, vidrio, dextrano, celulosa o gelatina. Comúnmente la superficie de los microcarriers debe modificarse químicamente para mejorar la eficiencia de adhesión de las células. Para esto, se usan materiales iónicos, como DEAE o cationes de amonio cuaternario, y materiales

no iónicos como proteínas de la matriz extracelular [27]. En la Tabla 3.1 se describen las características de microcarriers utilizados para propagar todo tipo de células mesenquimales humanas.

Tabla 3.1: Característica de microcarriers comerciales [28-30]

Microcarrier	Proveedor	Diámetro [μm]	Matriz	Densidad	Cubierta	Carga	Porosidad	Superficie [cm^2/g]
SoloHill Collagen	SoloHill Eng.	125 - 212	Poliestireno	1,02	Colágeno	No	No poroso	360
Cultispher G	Percell - Biolytica	130 - 380	Gelatina	1,04	-	No	Macroporo	7500
Cytodex 1	GE Healthcare	147 - 248	Dextrano	1,03	DEAE	+	Microporo	4400
Cytodex 3	GE Healthcare	141 - 211	Dextrano	1,04	Colágeno	No	Microporo	2700
Cytopore 2	GE Healthcare	200 - 280	Celulosa	1,03	DEAE	+	Microporo	1100
DE53	Whatman	70 - 190	Celulosa	1,1	DEAE	+	Microporo	6800
Enhanced attachment glass	Corning	125 - 212	Poliestireno	1,02	Vidrio	No	No poroso	360
FACT III	SoloHill Eng.	125 - 212	Poliestireno	1,02	Colágeno	+	No poroso	360
Hillex	SoloHill Eng.	160 - 180	Dextrano	1,11	Catión de amonio cuaternario	+	No poroso	515
Plastic	SoloHill Eng.	125 - 212	Poliestireno	1,02	-	No	No poroso	480
Plastic Plus	SoloHill Eng.	125 - 212	Poliestireno	1,02	-	+	No poroso	480
ProNectin F	SoloHill Eng.	125 - 212	Poliestireno	1,02	Fibronectina recombinante	No	No poroso	480
Synthemax II	Corning	125 - 212	Poliestireno	1,02	Synthemax II	No	No poroso	360

El criterio de elección del microcarrier, dependerá principalmente del es el uso que se darán a las células. En término generales deben ser no tóxicos, biocompatibles y facilitar la adhesión, proliferación y cosecha de las células. En el caso de medicina regenerativa, además de las características mencionadas, se deben mantener las propiedades de las células mesenquimales [27, 31], sin embargo muchas de las opciones que disponibles pueden alterar el potencial de diferenciación de las MSC [30, 32].

3.2. Composición del cultivo

Para la adaptación exitosa de las células a un cultivo en suspensión, existen una serie de elementos clave, los cuales deben ser evaluados. Estos incluyen variables físicas como la agitación y la presión parcial de oxígeno, y bioquímicas, incluyendo la composición del medio de cultivo y el uso de surfactantes.

3.2.1. Medios de cultivos

El medio de cultivo es uno de los componentes esenciales para el crecimiento y la proliferación, pues contiene todos los nutrientes, factores de crecimiento y hormonas necesarias para recrear el microambiente del cultivo. Si bien, la mayor parte de las células comparten requerimientos nutricionales comunes, se pueden diseñar medios especiales que optimicen algunos de los parámetros del cultivo, como por ejemplo, la producción de biomasa.

El medio basal es una formulación química definida desarrollada para satisfacer los requerimientos nutricionales mínimos de un tipo celular. En la Anexo .1 se muestra la composición de

3 medios comerciales. Dentro de ellos, Dulbecco Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM) es una de las formulaciones más utilizadas, contiene doble concentración de aminoácidos y cuatro veces la cantidad de vitaminas que los medios de cultivo mínimos, así como nitrato férrico, piruvato de sodio y algunos aminoácidos suplementarios, por lo que permite cultivar una amplia gama de células, incluyendo las hASC [33, 34].

Ham's F12 es una mezcla de nutrientes utilizada para el crecimiento de células mamíferas en ausencia de suero. Contiene una alta concentración de aminoácidos, vitaminas y elementos traza, además de ácido linoleico. Comúnmente se mezcla en relación 1:1 con DMEM, obteniendo DMEM/F12, el cual es un medio extremadamente rico y complejo, por lo que se utiliza en el crecimiento de una amplia gama de células y en el estudio sus características biológicas [34].

Alpha MEM (α -MEM) es una modificación del Minimum Essential Medium (MEM), la cual contiene aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, ácido lipoico, vitamina B12, biotina, ácido ascórbico y nucleosidos. Este medio suele utilizarse en células con requerimientos nutricionales especiales, por lo que entre sus principales aplicaciones está la maduración de embriones humanos en fibroblastos y cultivos primarios [35].

3.2.2. Calcio

El calcio participa en un sinnúmero de funciones celulares, donde la adhesión es una de las más relevantes. Muchas de las proteínas presentes en la matriz extracelular son dependientes de Ca^{+2} , por lo tanto, si se mantiene una baja concentración en el medio, se puede reducir la agregación en cultivo en suspensión. Sin embargo, determinar el valor óptimo es complejo, pues al eliminar totalmente su presencia en el medio, se puede afectar la morfología y los procesos de señalización [36].

Normalmente la concentración extracelular fisiológica de Ca^{+2} varía entre 1 - 3 mM, por lo que muchos de los medios clásicos contienen 1,8 mM. Preferiblemente la concentración en el cultivo debe ser cercana a los 50 μ M y los medios "libres de calcio", pueden contener hasta 100 μ M, [37]. Sin embargo, también es posible agregar agentes quelantes, los cuales secuestran los iones de calcio presentes en el medio de cultivo. El EDTA, es uno de los compuestos más utilizados y se caracteriza por quelar todo tipo de iones bivalentes (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , and Ca^{+2}), lo cual podría causar un desbalance iónico en el cultivo. En este sentido, en este tipo de aplicaciones, es mucho más conveniente utilizar EGTA, ya que es selectivo para iones de Ca^{+2} [38].

3.2.3. Glucosa

La glucosa es la principal fuente de carbono en el medio de cultivo. Su concentración, variar entre 1 g/L (5,5 mM) y 5 g/L (27,5 mM). La formulación original de DMEM y (α -MEM) contienen 5,5 mM de glucosa, lo cual es aproximadamente la concentración de azúcar en la sangre en condiciones fisiológicas, pero existen variantes que pueden contener hasta 25

mM (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Concentración de glucosa medios de cultivos (Gibco)

Medio	Concentración glucosa
α MEM	5,5 mM
DMEM baja	5,5 mM
DMEM/F12 baja glucosa	7,5 mM
DMEM/F12 alta glucosa	17,5 mM
DMEM alta glucosa	25 mM

La concentración óptima dependerá principalmente del tipo de célula y de su aplicación. Los medios de alta glucosa son recomendables para cultivos de rápido crecimiento y alta densidad, debido a la alta disponibilidad de nutrientes [33]. Está reportado que las condiciones de hiperglicemia generan un envejecimiento prematuro en las células madre, reduciendo la proliferación [39]. Por lo tanto, es necesario determinar la concentración de azúcar en el medio que permita un crecimiento óptimo.

3.2.4. Suero

El suero es una mezcla compleja que se obtiene de la coagulación y remoción de las células sanguíneas. Contiene una serie de elementos esenciales para el crecimiento celular como aminoácidos, factores de crecimiento, vitaminas, metabolitos, hormonas, lípidos, y minerales, por lo que se añade 5–10 % al cultivo.

El suero bovino fetal (FBS) es uno de los sueros más utilizados y se obtiene del procesamiento de sangre fetal recolectada durante el proceso de faenamiento del ganado. Su uso en cultivos celulares es controversial, ya que su composición esta poco definida y presenta riesgo de contaminación biológica. Esta variación, tiene efecto sobre el desarrollo y la diferenciación celular, lo cual supone un riesgo importante para la fabricación de productos biológicos de uso humano [40].

El lisado de plaquetas humano (hPL) es un producto derivado del criotratamiento del concentrado de plaquetas humano, el cual es rico en factores de crecimiento y citoquinas necesarios para la proliferación de distintos tipos de células madre [41]. En los últimos años se ha promovido el uso del hPL, como sustituto del FBS, en particular para aplicaciones en medicina regenerativa y terapia celular. Además de ser una alternativa segura y libre de componentes animales (*xeno-free*), ha demostrado tener un mayor potencial de expansión para células mesenquimales que el FBS [42, 43].

3.2.5. Antioxidantes

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) y la capacidad biológica de reparar el daño producido por los pe-

róxidos y los radicales libres. Estas especies se forman naturalmente como subproducto del metabolismo de la glucosa y tienen un rol importante en la señalización celular, sin embargo, el cultivo *in vitro* puede exacerbar esta condición [44, 45].

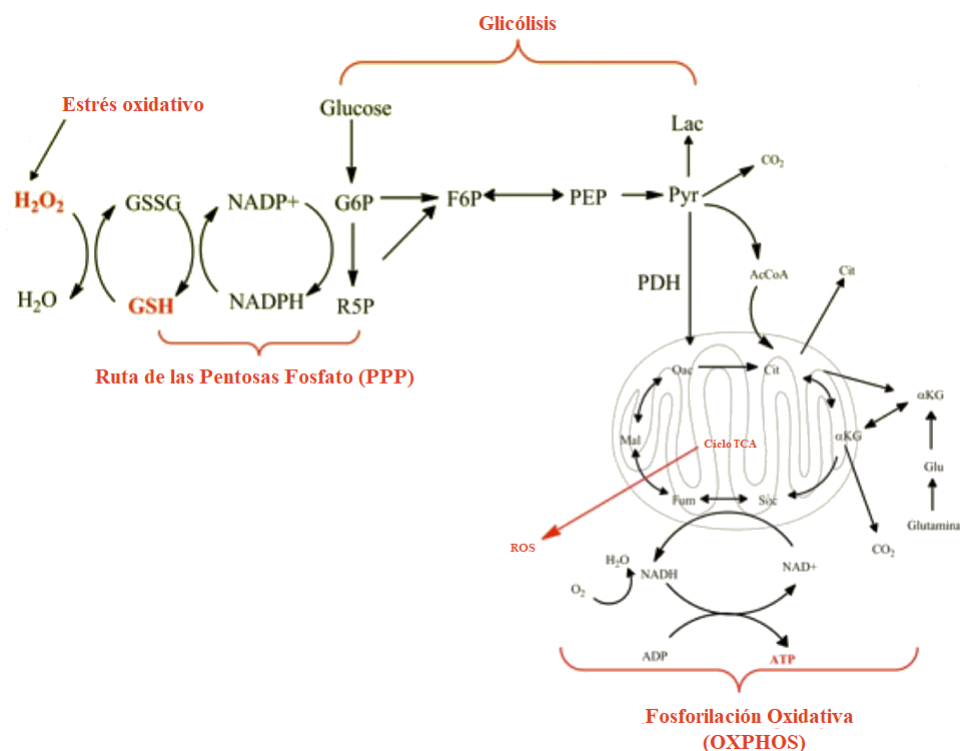


Figura 3.5: Ruta metabólica de la glucosa en células mesenquimales obtenidas desde tejido adiposo (adaptación) [45]

Comúnmente el cultivo celular se realiza a 21 % de O_2 , pero, en condiciones fisiológicas pueden encontrarse entre 8 % a 1 % de O_2 , dependiendo del tejido de procedencia [46]. La exposición prolongada a altos niveles de oxígeno y glucosa, aumenta la producción de radicales libres. Por otra parte, la presencia de iones de hierro, cobre y otros metales de transición presentes en los medios de cultivos comerciales, así como la escasez de antioxidantes que se obtienen directamente de la dieta, induce el estrés oxidativo [47].

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir el daño celular. Existen una amplia variedad de estos compuestos utilizados frecuentemente para suplementar los medios de cultivo. Entre ellos, se encuentra reportados efectos positivos sobre el metabolismo celular al utilizar ácido ascórbico, selenito de sodio, etaloamina, putrescina y N-acetilcisteína (NAC) [45, 48, 49]. Pese a sus beneficios, es importante regular su uso; en altas concentraciones, los antioxidantes pueden inducir senescencia prematura y alterar el potencial de diferenciación [50, 51].

3.2.6. Surfactantes

Los polímeros sintéticos o surfactantes son ampliamente utilizados en cultivos en suspensión a gran escala, para proteger a las células de los esfuerzos de corte producidos por la agitación y la aireación. Altas concentraciones de estos compuestos, pueden resultar tóxicos para las células [52].

Pluronic F-68 es un surfactante no iónico, compuesto por una cadenas hidrofóbicas de polioxipropileno y polioxietileno, las cuales le permite amortiguar el estrés celular y proteger las membranas celulares. Comúnmente se añade 0,1 % al medio de cultivo [53], pero existen trabajos que reportan tolerancia de hasta un 0,2 % para las células madre, sin comprometer el potencial de diferenciación [54].

El polietilenglicol (PEG) es otro agente que se utiliza en cultivos en suspensión para reducir el daño en células mamíferas, a una concentración entre 0,01 % - 2 % [55]. Pese a que no existen trabajos que relacionen directamente el uso de PEG como surfactante para el crecimiento de MSC, es utilizado para la construcción de *scaffolds* o hidrogeles [56], lo que lo convierte un buen candidato.

Otros compuestos como el alcohol polivinílico (PVA) o la metilcelulosa, son utilizados como aditivos para la protección de las células y presentan buena biocompatibilidad [56, 57]. Su uso se descarta, ya que está reportado que pueden afectar el potencial de diferenciación de las células [58, 59]

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Reactivos

- Ácido ascórbico (Sigma, A4544)
- Azul tripán (Sigma, T8154)
- Bicarbonato de Sodio (Merk, 106392)
- Buffer fosfato salino (Gibco, 21600-010)
- Cilindro CO_2 (Linde)
- Colagenasa tipo I (Worthington, LS004196)
- Colorante Alzarin Red (ChemCruz, sc-205998)
- Colorante Oil Red (ChemCruz, sc-203749)
- Cristal violeta (Merk, 42555)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma, D2650)
- DMEM Alta glucosa (Gibco, 12100-046)
- DMEM Baja glucosa (Gibco, 31600-034)
- EGTA (Merk, 324626)
- Etaloamina (Sigma, E0135)
- Suero Bovino Fetal (FBS) (Biowest, S1560)
- Ham's F12 Nutrient Mixture (Gibco, 21700-075)
- Lisado de Plaquetas Humano (Gene X-Press, 06960)
- Kit medición glucosa (Biosystems, 12800)
- Kit medición lactato (Biosystems, 12802)
- MEM Alpha modification Baja glucosa (Gibco, 11900-024)
- Microcarrier Cytodex 3 (GE Healthcare, 17-0485-01)
- Microcarrier Solohill (Sigma, Z378674)
- N-Acetyl-L-cisteína (Sigma, A9165)
- PEG 8000 (Sigma, P1458)
- Pluronic F68 10% (Gibco, 24040-032)
- Putrescina (Sigma, P5780)
- Safranina
- Selenito de Sodio (Sigma, S5261)
- StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco™ código A10070-01)
- StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco™ código A10071-01).
- StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco™ código A10072-01)
- TrypLE (10X) (Gibco, A12177)

4.1.2. Equipos

- Agitador magnético (Barnstead Thermolyne, 45600 cellgro™ Stirrer)
- Analizador automático en Random Access. (Biosystem, Y15)
- Baño térmico (Labtech)
- Cámara de flujo laminar (Nuare, Nu201330E)
- Centrífuga Boeco C-28
- Centrífuga Eppendorf 5403
- Incubadora (Shel Lab, TC2323)
- Microscopio (Olympus, CK2)
- pHmetro (HANNA)
- Refrigerador -80°C (SO-LOW, U85-13)
- Tanque N₂ líquido (Taylor Wharton XT20)

4.1.3. Material de laboratorio

- Agua Desionizada
- Agua Destilada
- Botellas 250 y 500 mL
- Cámara Neubauer
- Contador
- Etanol
- Filtros 0,2 μm (Sigma)
- Matraz Erlenmeyer 2 mL
- Micropipetas p1000, p200 y p20
- Mr. Frosty (Thermo Scientific Nalgene Mr. Frosty)
- Pipeta plástica estéril 2, 5, 10 y 25 mL
- Placas 24 pocillos
- Placas Petri grado cultivo 60mm
- Propipeta (Drummond)
- Puntas p1000, p200 y p20
- Rotor de reacción (Biosystems, AC11485)
- Spinner flask (Wheaton)
- T-flask 175
- Tubos eppendorf 1,5 y 0,6 mL
- Tubos falcon 15 y 50 ml

4.2. Obtención células

Las células fueron proporcionada por el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile (ICBM), obtenidas desde lipoaspirado a nivel de la cintura. Todos los donantes fueron de sexo femenino, entre 20 y 50 años, sin uso crónico de fármacos ni anticonceptivos, sin tabaquismo activo y con un índice de masa corporal (IMC) menor a 30. Las muestras tienen la aprobación del Comité de ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y la previa autorización de cada uno de los pacientes mediante consentimiento informado.

Se incubaron entre 50 y 100 mL de tejido lipoaspirado con colagenasa tipo I 0,2% p/v por 1 hora a 37°C o hasta conseguir una mezcla homogénea. La digestión resultante fue centrifugada a 1000 rpm por 20 minutos. De las fracciones obtenidas, se descartaron todas menos el pellet celular, el cual fue resuspendido en medio de cultivo suplementado con 10% FBS (Biowest, S1560), sembrado en placas T-flask de 25 cm^2 (T-25) e incubando a 37°C y 5% de CO₂. Luego de 48 hora, se descartó el medio de cultivo, las placas fueron lavadas con buffer fosfato salino 1X (Gibco, 21600-010) y se conservaron las células adheridas.

4.3. Cultivo celular adherente y banco de células

El cultivo se realizó en T-flask de 175 cm^2 (T-175) con suplementado con 10 % de Suero Bovino Fetal (FBS). Se sembraron 5000 cel/cm^2 y se incubaron en una atmósfera controlada a 37°C y 5 % de CO_2 , con un cambio de medio programado 2 veces por semana. Al alcanzar un 80 % de confluencia, se realizó un subcultivo celular, dividiendo la cantidad total de células en tres T-175 (pasaje 1:3). Este procedimiento se repitió hasta alcanzar un máximo de 10 subcultivos.

En cada iteración, se destinaron células a criopreservación, resuspendiendo en 90 % SFB y 10 % DMSO (Sigma, D2650) a una concentración entre $1 - 2 \cdot 10^6 [\text{cel/ml}]$. La solución resultante se alicuotó en crioviales, los cuales se congelaron bajo condiciones semicontroladas en reservorios con isopropil OH (Thermo Scientific Nalgene Mr. Frosty) y posteriormente se guardaron en un Master y Working Bank, conformando así el banco de células de trabajo.

4.4. Cultivo en suspensión

Los cultivos en suspensión se llevaron a cabo en *spinner flask*, los cuales fueron previamente preparados, lavando con HCl 70 % e impregnando las paredes con silicona. Una vez secos, se armó cada una de las partes y se esterilizó bajo autoclave.

4.4.1. Cultivo en esferoides

El cultivo fue inoculado una concentración inicial de $0,5 \cdot 10^6 [\text{cel/ml}]$, dentro de una incubadora a 37°C y 5 % de CO_2 . Las células se agitaron durante 12 horas a 50 rpm, para la formación de los esferoides y posteriormente a 100 rpm, para el resto del cultivo.

4.4.2. Cultivo en microcarrier

Para el crecimiento en microcarrier Solohill se utilizó una concentración igual a 10 g/L (250 cm_2), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregaron 30 mL de agua desionizada a los microcarriers y se autoclavaron.

Los microcarrier Cytodex 3 se utilizaron a una concentración de 7,5 g/L (1000 cm_2), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Previamente, se hidrataron en PBS libre de Mg^{+2} y Ca^{+2} , por al menos 3 horas a temperatura ambiente. Luego, los microcarriers se lavaron y resuspendieron en 30 mL de PBS fresco, para ser autoclavados.

Luego, se esperó a que los microcarriers decantaran, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 25 mL de medio fresco con 1 % de FBS. El cultivo se inoculó a una concentración inicial de $0,2 \cdot 10^6 [\text{cel/ml}]$ y se le aplicaron 8 ciclos de agitación intermitente

(2 minutos a 50 rpm y 28 minutos sin agitación). Una vez terminado, se aforó el cultivo a 50 mL con 10% FBS y se dejó agitar a 50 rpm. Se realizaron cambios de medio programados cada 48 horas para el cultivo en SoloHill y cada 24 horas para el cultivo en Cytodex 3.

4.4.3. Cosecha

Para la etapa de recuperación, se dejaron decantar los microcarriers, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS. La mitad del cultivo, se trató con colagenasa 0,05% a 37°C, con agitación ocasional. El resto, se resuspendió durante 5 minutos en PBS con 0,02% de EDTA, pH 7,6. Luego, se reemplazó el PBS con TrypLE 2X a 37°C, con agitando constantemente. Finalmente, las enzimas se retiraron del medio de cultivo, centrifugando la solución, por otra parte el pellet se resuspendió en medio fresco, separando las células de los microcarrier por medio de un filtro para células.

4.5. Caracterización del cultivo

4.5.1. Curva de crecimiento adherente

Los cultivos se inocularon a una densidad de 5000 [cel/cm²] en placas pocillos de 60 mm. Se cuantificó la densidad (X) y viabilidad celular, utilizando método de exclusión con azul de tripán, durante 18 días, en intervalos regulares.

4.5.2. Curva de crecimiento en suspensión.

Para el cultivo en esferoides, desde 1 mL de muestra del cultivo, se cuantificó diariamente la densidad (X) y viabilidad celular, utilizando método de exclusión con azul de tripán (Sigma, T8154), durante 10 días o hasta que el cultivo tenga una viabilidad menor al 80%.

Para el cultivo en microcarriers, la eficiencia de pegado se estableció por diferencia entre el sembrado y el conteo de densidad (X) en la solución, con método de exclusión de tripán. Para el crecimiento cuantificó diariamente la densidad (X) de 1 mL de cultivo, por medio de conteo de núcleos con cristal violeta.

Durante la etapa de recuperación se tomaron muestras a los 10, 30 y 60 minutos de reacción. Se cuantificó la la concentración de células con métodos de exclusión de tripán.

4.5.3. Tasas Específicas de Consumo/Producción

Paralelamente a la medición de densidad celular, a partir de 1 ml de sobrenadante, se cuantificó concentración glucosa y lactato utilizando kits de medición comercial.

A partir de los resultados obtenidos se calcularon parámetros cinéticos como las tasas específicas de consumo (q_c) o producción (q_p), el número de células viva (X_v), la velocidad específica de crecimiento (μ), la velocidad máxima de crecimiento (μ_{mx}), que caracteriza el crecimiento exponencial y permite determinar el tiempo de duplicación (t_d)

$$X_v = X \cdot V \quad (4.1)$$

$$\mu = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_v}{dt} \quad (4.2)$$

$$q_c = \frac{-1}{X_v} \cdot \frac{dC}{dt} \quad (4.3)$$

$$q_p = \frac{-1}{X_v} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (4.4)$$

El cálculo de las tasas específicas de consumo o producción, se determinan generando una curva acumulativa, sumando las diferencias de cantidad de metabolito presente en el medio entre dos tiempos consecutivos y ajustando un polinomio a la curva resultante. Las tasas específicas se calculan como la derivada de la curva evaluada en el tiempo t, dividida por la densidad celular en t. Así, se define la razón lactato : glucosa ($\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$)

$$\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc} = \frac{-q_{lac}}{q_{glc}} \quad (4.5)$$

4.5.4. Potencial de diferenciación

El potencial de diferenciación se realizó utilizando kits de diferenciación comerciales bajo las instrucciones del fabricante (ver Tabla 4.1). Cada condición se probó en placas de 24 pocillos, usando dos pocillos con medio de diferenciación y dos pocillos de control, con cambios de medio programados 2 veces por semana. La diferenciación se confirma mediante tinción, visualizada bajo microscopía óptica.

4.5.5. Citometría de flujo

El ensayo inmunotipificación fue llevado a cabo por el Instituto de Ciencias e Innovación en Medicina (ICIM) de la Universidad del Desarrollo y la Clínica Alemana. Para la citometría se reunieron por condición a evaluar, 3 millones de células previamente tripsinizadas, en 1 mL de medio de cultivo fresco. Se analizó el panel de marcadores: CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR, CD90, CD105, CD44, CD73 y CD29.

Tabla 4.1: Ensayo de diferenciación a linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico

Diferenciación	Kit	Duración	Sembrado	Tinción
Adipogénica	StemPro Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco, A10070-01)	8 días	10000 cell/cm ²	Oil Red
Condrogénica	StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, A10071-01)	15 días	25000 cell/cm ²	Alzarin Red
Osteogénica	StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco, A10072-01)	21 días	15000 cell/cm ²	Safranina

4.6. Diseño experimental

4.6.1. Cultivo adherente

Se probaron 5 medios de cultivos, variando el medio basal, la concentración de glucosa y el uso de antioxidantes. Todas las experiencias se realizaron en cultivo adherente a las indicaciones de la sección 4.3 y caracterizadas de acuerdo a los métodos de la sección 4.5. La condición con mejores parámetros de cultivo se utilizó para ensayos posteriores y se verificaron los marcadores fenotípicos con citometría de flujo (sección 4.5.5). A continuación se presentan los medios de cultivo propuestos

- Medio A: DMEM/F12 7,5 mM de glucosa (Control)
- Medio B: DMEM/F12 25 mM de glucosa.
- Medio C: DMEM 5 mM de glucosa.
- Medio D: DMEM 5 mM de glucosa suplementado con ácido ascórbico 0,25 mM, etaloamina 1,7 mM, selenito de sodio 29 mM, putrescina (0,018 mg/L) y N-acetilcisteína 0,1 mM.
- Medio E: α -MEM 5,5 mM de glucosa.

Posteriormente se evaluó el uso de lisado de plaquetas humano, en reemplazo del suero bovino fetal. Para esto se realizó una curva de crecimiento para un cultivo adherente en 10% FBS (control) y 5% hPL. En cada caso, se determinó el crecimiento, viabilidad y consumo/producción de metabolitos, a partir de los métodos de la sección 4.5.

Previo a los cultivos en suspensión, se probó una variante de medio de cultivo sin calcio: α -MEM 5,5 mM de glucosa, quelado con 2mM de EGTA, en cultivo en placas adherente y no adherentes. Se estudio el crecimiento y viabilidad, bajo las indicaciones de la sección 4.3.

De igual manera, se diseñó una experiencia para determinar la tolerancia de las células a Pluronic F68 y PEG 8000, para así proteger a las células de los esfuerzos de corte, propios del cultivo en suspensión. Para cada uno, se probaron 3 concentraciones diferentes surfactante, utilizando medio de cultivo solo como control. Para el Pluronic F68 se utilizó 0,01%, 0,1% y 0,2% p/v, mientras que para el PEG 8000 se usó 0,1%, 1% y 2% v/v. Se realizó cultivo adherente en todas las experiencias, determinando la proliferación y viabilidad luego de 14 días.

4.6.2. Cultivo en suspensión

Los cultivos en esferoides y microcarriers serán realizado y caracterizados de acuerdo a las indicaciones de las secciones 4.4 y 4.5, utilizando el medio de cultivo y surfactantes, seleccionado en base a los mejores parámetros de la parte anterior. Para la mejor condición obtenida, se cuantificó la recuperación y se realizaron el ensayo descrito en la sección 4.5.4 para establecer si las células mantuvieron su potencial de diferenciación. Adicionalmente, se midieron marcadores de membrana mediante citometría de flujo para verificar el fenotipo de las células (sección 4.5.5).

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1. Cultivo adherente

5.1.1. Medio de cultivo basal

En la Tabla 5.1 se muestra un resumen de los parámetros de cultivo calculados para cada uno de los medios que se probaron.

Tabla 5.1: Parámetro de cultivos para distintos medios basales

Medio basal	DMEM/F12 Baja Glucosa	DMEM/F12 Alta Glucosa	DMEM	DMEM AntiOX	α -MEM
Máxima biomasa[10^6 cel/mL]	0,12	0,08	0,15	0,18	0,22
μ_{\max} [h^{-1}]	0,0027	0,0023	0,0037	0,0062	0,0078
t_d	9 días	12 días	5 días	4 días	41 horas
$\Delta L/\Delta G$	1,71	1,98	1,68	1,59	1,41

En la Figura 5.1.a se muestra la curva de crecimiento basal para el cultivo de hASC, en DMEM/F12 de baja glucosa. El cultivo tuvo una duración aproximada de 18 días, con una viabilidad sobre el 85 % a lo largo de todo el experimento, alcanzando una concentración máxima de $0,12 \cdot 10^6$ [cel/ml] y un tiempo de duplicación cercano a 9 días (Tabla 5.1).

Las curvas de lactato y glucosa, tienen un comportamiento oscilatorio debido a la reposición constante de medio de cultivo cada 3 días (Figura 5.1.b). Esto permite prolongar el tiempo de vida de cultivo, gracias a la disponibilidad constante de glucosa. Este tipo de células son capaces de soportar hasta 35 mM de lactato sin afectar la proliferación celular [60] y la concentración en cultivo no supera los 10 mM, por lo que no existe un efecto inhibitorio del lactato sobre el crecimiento. A partir de las tasas acumulativas de glucosa y lactato, se calcula la razón $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,71$. Teóricamente se producen 2 mol de lactato por cada mol de glucosa consumido [61], lo cual indica que las células están utilizando la glucosa como principal fuente de carbono.

Los parámetros de crecimiento (Tabla 5.1) son similares a los presentados en trabajos previos [62], pero en términos generales se alejan bastante de lo que está reportado en la literatura, en donde los tiempos de duplicación oscilan entre 36 y 96 horas [63]. Bajo estas condiciones es poco factible llevar este cultivo directamente a suspensión. La densidad mínima para sembrar un *spinner* son $0,10 \cdot 10^6$ [cel/ml] en 50 mL de medio y desde un lipoaspirado, se necesitarían al menos 20 días de cultivo adherente. En consecuencia, es necesario buscar otras alternativas de medio de cultivo que se ajusten mejor a los requerimientos nutricionales de las células y así mejorar la tasa de proliferación

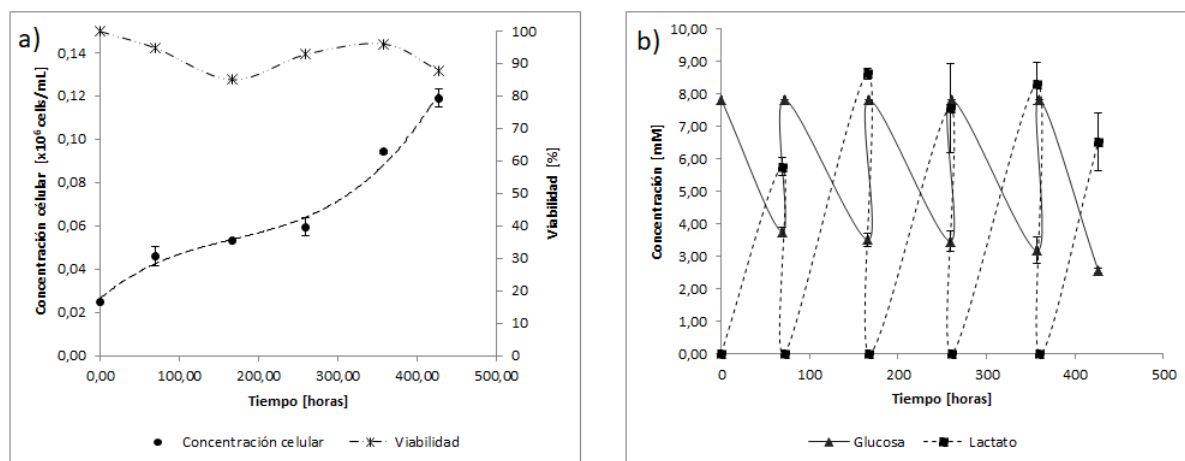


Figura 5.1: Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en DMEM/F12 baja glucosa. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato

La glucosa es la principal fuente de carbono del medio del cultivo, por lo que una mayor disponibilidad podría permitir alcanzar una mayor concentración de células. Se realizó una variación del cultivo basal en DMEM/F12 de alta glucosa (Figura 5.2), la curva de crecimiento indica que la densidad máxima es un 33,3% menor con respecto al control, llegando a $0,08 \cdot 10^6$ [cel/ml] y aumentando el tiempo de duplicación a 12 días. Como se puede ver, la viabilidad se mantiene sobre el 95%, aún cuando el cultivo está en estado estacionario. Este valor puede estar sobrestimado, pues las células al morir, tienden a perder sus características adherentes [64], por lo que se pierden durante el proceso de lavado y no es posible cuantificarlas.

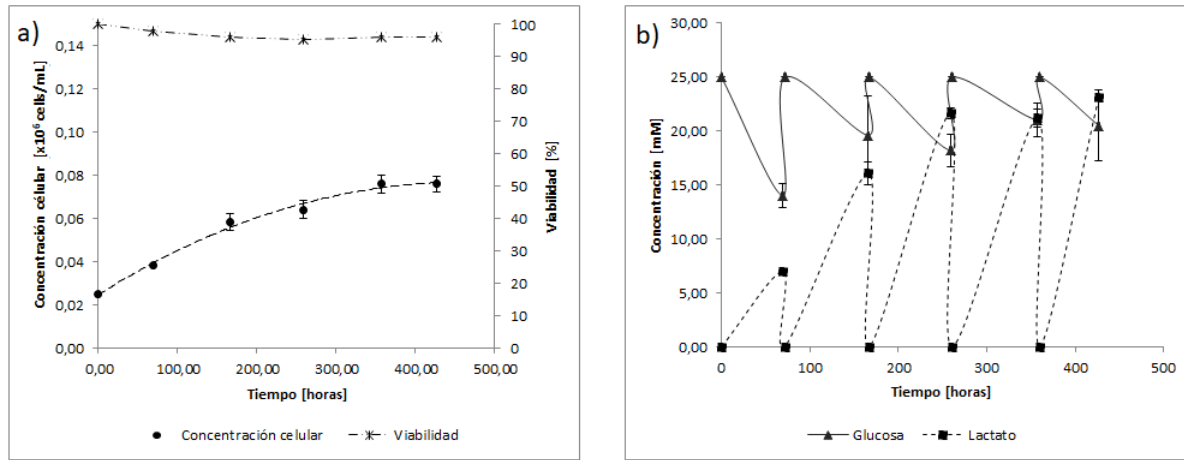


Figura 5.2: Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en DMEM/F12 alta glucosa. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato

En cuanto al consumo de glucosa, se observa una disminución sostenida en el tiempo, la cual está acompañada de un aumento de la producción de lactato. Como resultado se obtiene un $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,98$, lo cual no indica una mejora en el estado metabólico. A diferencia de otro tipo de cultivo, las células mesenquimales son sensibles a la hiperglicemia. La exposición a altas concentraciones de glucosa genera un aumento del estrés oxidativo y un aumento en la liberación de factores senescentes [65], lo cual explica el efecto negativo en la proliferación de los cultivos. De igual manera, el aumento en la producción de lactato puede ser consecuencia de un aumento en la apoptosis y no al consumo de glucosa.

En base a lo anterior, se puede ver que la optimización del crecimiento no se relaciona con la disponibilidad de fuentes de carbono, por lo que se propone probar diferentes de medios basales de baja glucosa. DMEM y α -MEM son dos variantes, ampliamente utilizadas en el cultivo de células madre.

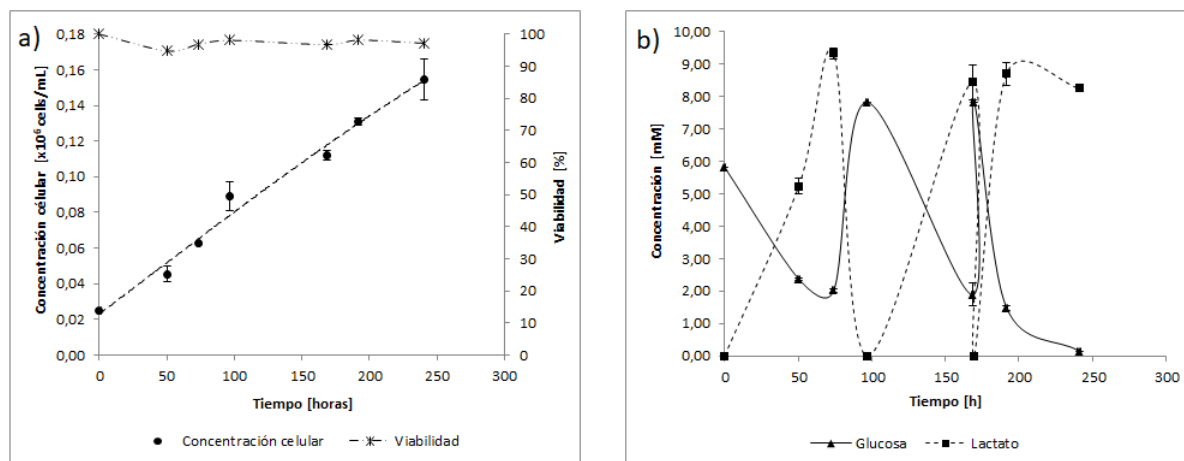


Figura 5.3: Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en DMEM baja glucosa. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato

La Figura 5.3 se presentan los resultados para un cultivo en DMEM. El crecimiento muestra una disminución del tiempo de duplicación a 112 horas (5 días), llegando a una máxima densidad de $0,15 \cdot 10^6$ [cel/ml] a los 10 días de cultivo y un $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,68$. En las curvas de proliferación y metabolitos con α -MEM (Figura 5.4), la máxima biomasa se alcanza a los 8 días de cultivo, reduciendo el tiempo de duplicación a 48 horas y obteniendo un total de $0,22 \cdot 10^6$ [cel/ml]. De igual manera, se calculó una razón $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,41$, lo que indica una mejora considerable en el estado metabólico. En ambos casos, la duración total de la experiencia cambió a 10 días, incluso en la proliferación con α -MEM se logran ver todas las fases propias de una curva de crecimiento.

Si bien el metabolismo de los aminoácidos en las células mesenquimales es aún desconocido, se sabe que hay 14 necesarios para su crecimiento, de los cuales 8 son esenciales (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina y valina) y 6 no esenciales (arginina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, serina y tirosina) [66]. En este sentido, el α -MEM, tiene en su formulación el perfil completo de aminoácidos y debería ajustarse mejor a los requerimientos de las células, ya que el DMEM no contiene asparagina ni ácido aspártico, pero si se analiza en detalle, se puede ver que el DMEM posee entre 25 % y un 50 % más de aminoácidos esenciales. La opción para enriquecer el DMEM es suplementándolo con F12, de manera de tener los 20 aminoácidos en el cultivo. La mezcla resultante tiene una concentración que se asemeja bastante a la del α -MEM, pero en algunos casos, como la asparagina, el ácido aspártico y el ácido glutámico, la cantidad en el medio puede ser hasta 10 veces menor.

Adicionalmente, se sabe que la glutamato es el aminoácido de mayor consumo dentro de las células. La principal fuente de este es desde el metabolismo de la glutamina. Dentro de los medios presentados, el DMEM es el que contiene la concentración más alta de glutamina (584 mg/L), seguido por el DMEM/F12 (365 mg/L). Algunos aminoácidos como la arginina, histidina y prolina, se convierten en glutamato antes de entrar al TCA, pero tanto la arginina como la glutamina tienden a degradarse de manera espontánea en el cultivo, lo cual disminuye su disponibilidad y aumenta la concentración de amonio, lo cual puede resultar tóxico para las células [66]. Por este motivo, se podría añadir directamente glutamato al medio basal o suplementarlo con alguna variante más estable como el GlutaMAX.

En base a lo anterior, pareciera que la asparagina, el ácido aspártico y los aminoácidos esenciales, tendrían un rol relevante dentro del metabolismo celular, por lo que el DMEM suplementado con arginina y ácido aspártico o el α -MEM con aminoácidos no esenciales podrían ser buenos candidatos para medio de cultivo. Esto podría verificarse y complementarse realizando un estudio de consumo y producción de aminoácidos. Así mismo, el uso de algún sustituto de glutamina, podría mejorar la proliferación y el estado metabólico del cultivo.

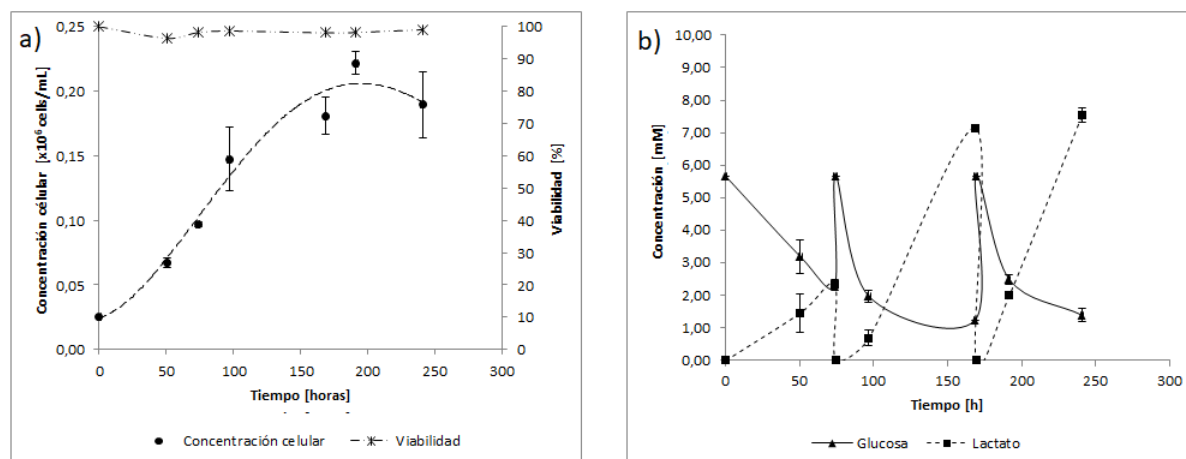


Figura 5.4: Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en α -MEM baja glucosa. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato

Por otra parte, a diferencia de otros medios basales, α -MEM contiene nucleosidos, los cuales son precursores de los ácidos nucleicos, intermediarios del metabolismo celular y juegan un rol fundamental en la proliferación celular. Comúnmente, estas moléculas se ingieren directamente de la dieta, sin embargo, en condiciones *in vitro* deben ser sintetizadas por las propias células [67]. La glucosa presente en el medio de cultivo tiene 2 posibles destinos dentro del metabolismo celular. Por una parte, se puede utilizar como fuente principal de energía, ya sea a través de la glicólisis (vía anaeróbica) o la fosforilación oxidativa (vía anaeróbica). Por otro lado, puede ingresar como precursor la ruta de las pentosas fosfato (PPP), para la síntesis de nucleosidos [45]. Dicho esto, al agregar nucleosidos directamente al medio de cultivo, se reduciría el uso de esta vía y se desviaría todo el uso de glucosa hacia la producción de energía, lo cuál podría acelerar la producción de biomasa.

Tanto la fosforilación oxidativa como la ruta de las pentosas fosfato, tienen como subproducto una gran cantidad de ROS, lo cual inhibe el crecimiento celular y aumenta los factores senescentes. Para evitarlo, el mecanismo natural de las células madre es ocupar la vía glicolítica, la cual es más ineficiente desde el punto de vista energético [45]. Una manera de reducir estrés oxidativo, sin elevar la razón $\Delta Lac/\Delta Glc$, es regulando la presión parcial de oxígeno. Comúnmente el cultivo *in vitro* de células madre se realiza a 21% de O_2 , pero en condiciones fisiológicas se encuentran, dependiendo del tejido de procedencia, entre 8% a 1% de O_2 (hipoxia). La exposición de las células a condiciones ambientales, promueve la senescencia celular y la pérdida de viabilidad del cultivo [68]. En contraste, las condiciones de hipoxia han demostrado un potencial de proliferación 5 veces más grande, con respecto a las condiciones estándar de cultivo [69]. Desde el punto de vista técnico no es posible estudiar esta condición en el laboratorio, pero se deja propuesto para trabajos futuros ya que podría ser beneficioso para el metabolismo y el crecimiento celular.

Otra alternativa para abordar el problema, es agregando antioxidantes al medio de cultivo. Se sabe que la formulación de α -MEM contiene ácido ascórbico, el cual puede ayudar a reducir el estrés oxidativos, sin embargo, no sería posible determinar si este tipo de compuestos tienen o no un efecto positivo sobre el crecimiento. Dicho esto, se preparó una mezcla rica en antioxidantes (con ácido ascórbico 0,25 mM, etaloamina 1,7 mM, selenito de sodio 29 mM, putrescina (0,018 mg/L) y N-acetilcisteína 0,1 mM), utilizando DMEM como medio base y se realizó un cultivo bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores.

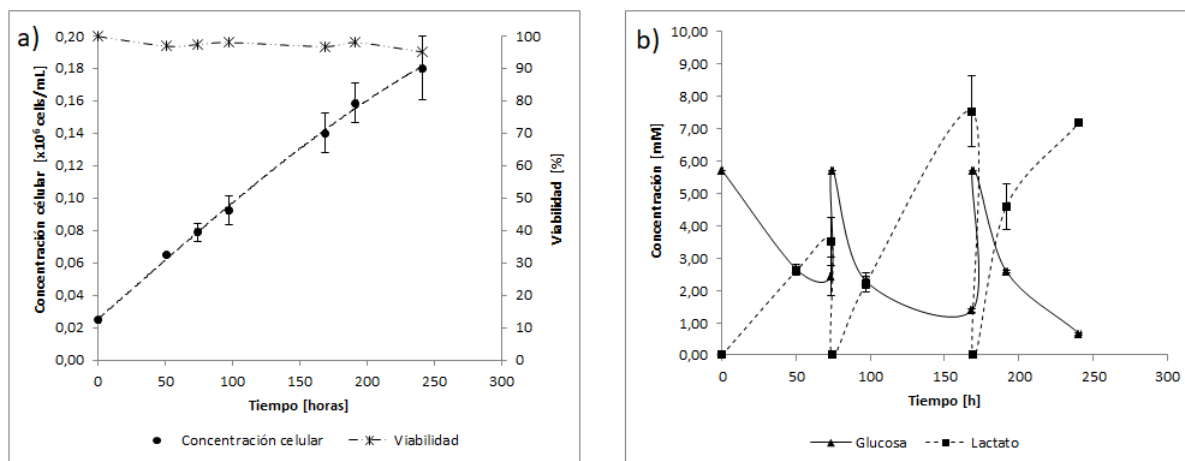


Figura 5.5: Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en DMEM bajo glucosa con antioxidantes. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato

Los resultados presentados en la Figura 5.5 señalan que las células son altamente sensibles al estrés oxidativo, ya que al añadir antioxidantes al medio de cultivo, tanto la proliferación como en el estado metabólico presentan una mejora con respecto al cultivo en DMEM. El tiempo de duplicación se redujo a 107 horas, la biomasa alcanza un total de $0,18 \cdot 10^6$ [cel/ml] y un $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,59$. Sin embargo, los parámetros de cultivo usando α -MEM como medio basal son más cercanos a los reportados en la literatura [63, 70], por lo se propone utilizar para el resto de las experiencias α -MEM con una mezcla de antioxidantes, el cual será denominado α -MEM AntiOX.

Se realizó un ensayo de inmunofenotipificación a células cultivadas en el medio propuesto, utilizando los marcadores establecidos por la ISCT. Los histogramas resultantes se encuentran resumidos en el Anexo .2. La población de células hASC tuvo expresión sobre el 95 % para los marcadores CD90, CD105 y CD3, mientras que para los marcadores CD45, CD34, CD19 y HLA DR fueron menores al 5 % (Tabla 5.2). Si bien al valor de CD11b está sobre el 5 %, no es una diferencia significativa, por lo que se considera un marcador negativo. En base a esto, las células cumplen con los criterios fenotípicos y por lo tanto α -MEM AntiOX es adecuado para la proliferación del cultivo.

Tabla 5.2: Expresión de marcadores de superficie en células hASC expandidas en cultivo adherente con α -MEM AntiOX

Marcador	Células positivas [%]
CD45 FITC	4,17
CD34 PE	0,62
CD11b FITC	5,17
CD19 FITC	4,12
HLA-DR PE	1,44
CD90 FITC	99,25
CD105 PE	100,00
CD44 FITC	91,75
CD73 PE	99,93
CD29 PE	100,00

5.1.2. Suplementos

Otro elemento relevante dentro del cultivo celular, además del medio del cultivo son los suplementos, los cuales aportan factores de crecimiento y hormonas involucradas en el crecimiento celular. En la Tabla 5.3 se muestra un resumen de los parámetros de cultivo calculados para cada uno de los suplementos testeados.

Tabla 5.3: Parámetros de cultivo para cultivo en FBS y hPL

Medio de cultivo	α -MEM AntiOX 10 % FBS	α -MEM AntiOX 5 % hPL
Máxima biomasa[10^6 cel/mL]	0,38	0,54
μ_{\max} [h^{-1}]	0,030	0,034
t_d	23 horas	21 horas
$\Delta L/\Delta G$	1,21	1,12

Las Figuras 5.6.a y 5.6.b, se presentan los resultados para el crecimiento y metabolitos para el cultivo en 10 % de FBS. La experiencia tuvo una duración aproximada de 120 horas con una viabilidad sobre el 90 % en todo momento, alcanzado la máxima concentración de biomasa hacia el final del cultivo con un valor de $0,38 \cdot 10^6$ [cel/ml] y un tiempo de duplicación de 23 horas. Las tasas acumulativas de lactato y glucosa permiten calcular $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,21$. Las curvas de proliferación para el lisado de plaquetas (Figura 5.6.a) indican que el cultivo alcanzó una densidad a las 96 horas de cultivo, de $0,54 \cdot 10^6$ [cel/ml], lo cual es aumento del 42 % en la biomasa total con respecto al cultivo con FBS. El tiempo de duplicación se reduce 22 horas y se determinó un $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,12$, de manera que el metabolismo celular no se ve afectado de manera negativa por el aumento de la proliferación.

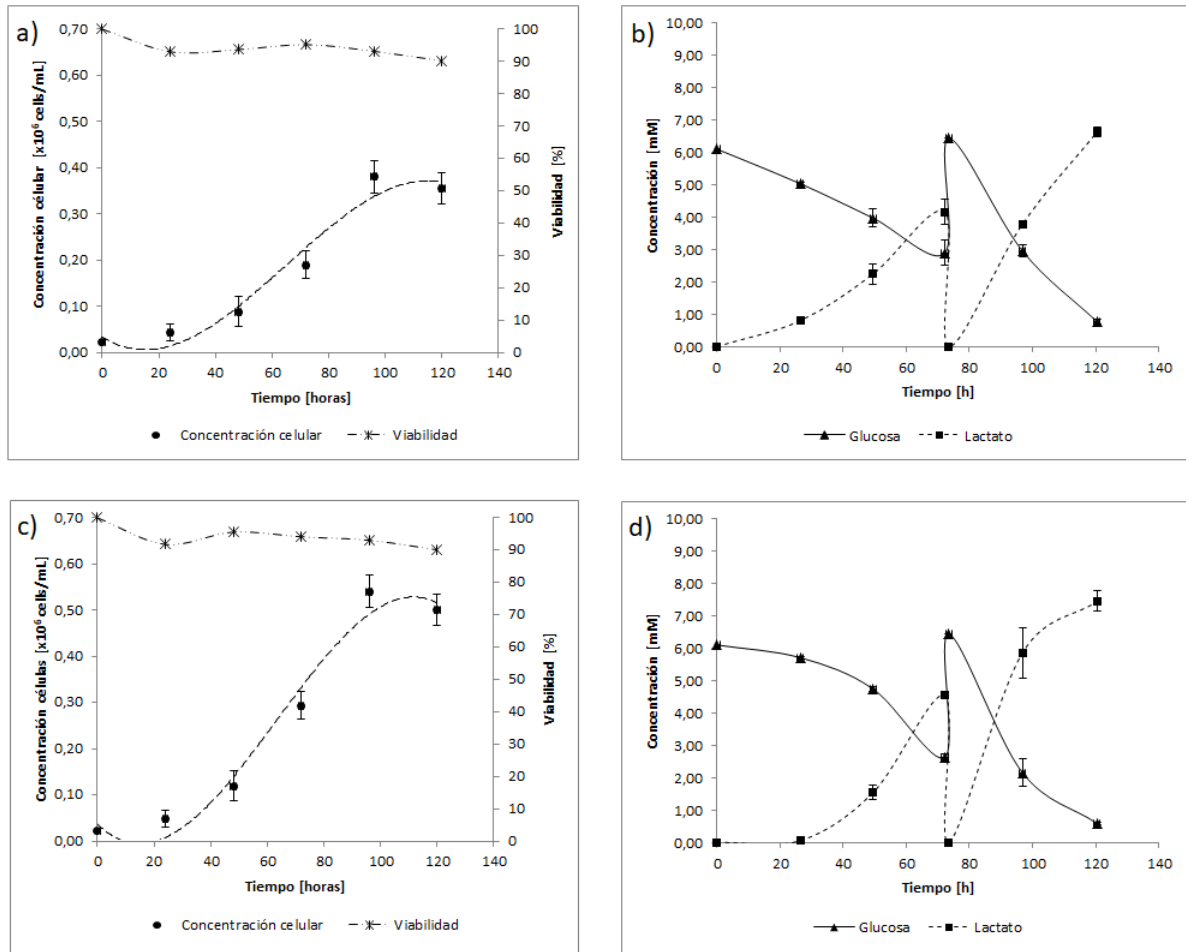


Figura 5.6: Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo adherente en 10 % suero bovino fetal (FBS) y 5 % lisado de plaquetas humano (hPL) a) Densidad celular y viabilidad 10 % FBS. b) Consumo de glucosa y producción de lactato 10 % FBS. c) Densidad celular y viabilidad 5 % hPL. d) Consumo de glucosa y producción de lactato 5 % hPL

No existe un motivo claro por el cual el hPL sea un mejor suplemento para las hASC que el FBS, particularmente porque la composición de ninguno de los dos, está completamente definida. Los componentes del suero bovino fetal pueden variar de lote a lote y en el caso del lisado de plaquetas, cambian de acuerdo a las características del donante [40, 71]. Ambos productos contienen factores, hormona y citoquinas que inducen la proliferación, pero puede que las variantes proteicas presenten en el hPL, se encuentren en una proporción más adecuada a los requerimientos celulares y al ser de origen humanos, sean asimiladas con mayor facilidad por las células. Si bien no se evaluó el potencial de diferenciación ni los marcadores inmunogénicos para el lisado de plaquetas, se encuentran ampliamente reportado la baja inmunogenicidad, el bajo riesgo de transmisión de patógeno y la capacidad de diferenciación a adipocitos, osteocitos y condrocitos [72-74], de manera que constituye un buen sustituto *xeno-free* al suero bobino fetal, para el cultivo de células con fines clínicos o terapéuticos.

5.2. Cultivo en suspensión

5.2.1. Medio libre de calcio

El calcio extracelular tiene un efecto importante sobre la adhesión y agregación celular, en diversos tipos de cultivo. Es interesante probar una variante libre de calcio y así obtener esferoides pequeños, facilitando el cultivo en suspensión. La concentración de EGTA se estimó por medio de una plataforma *on line* que permite calcular iones libres en presencia de múltiples agentes quelantes y metales [75]. En este caso medio de cultivo fue quelado con 2 mM de EGTA, para lograr una concentración de Ca^{+2} libre de $100 \mu\text{M}$. Este valor, permite mantener los mínimos requerimientos de señalización, sin dañar a las células [37].

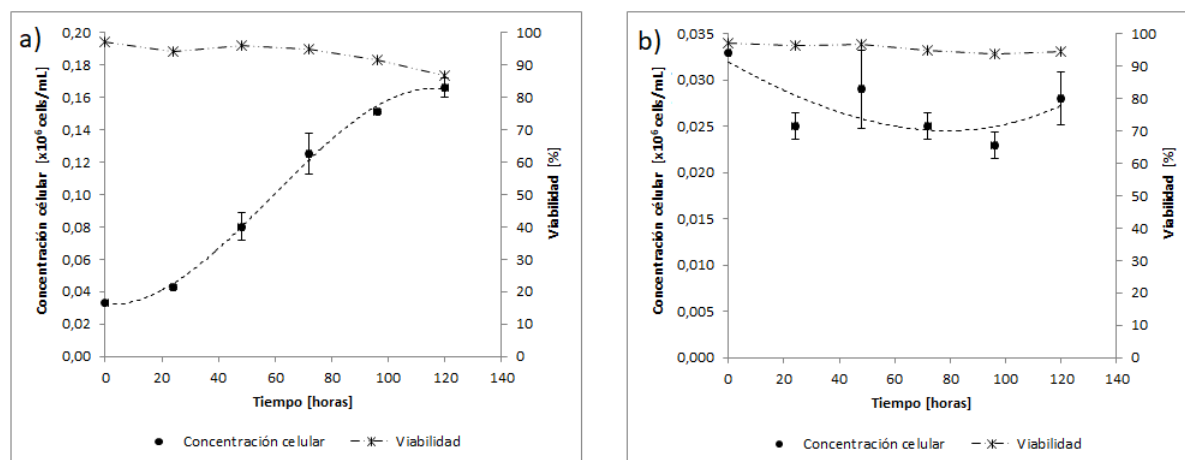


Figura 5.7: Curva de crecimiento para cultivo en α -MEM quelado con 2 mM de EGTA a) Cultivo en placa adherente b) Cultivo en placas no adherentes

El cultivo adherente sin calcio (Figura 5.7.a), tuvo una duración de 120 horas, llegando a una concentración máxima de $0,17 \cdot 10^6$ [cel/ml]. Si bien la población celular está en aumento, el desempeño del cultivo decae ante la ausencia de calcio. Por su parte, el cultivo no adherente mantiene una concentración más o menos en constante $0,026 \cdot 10^6$ [cel/ml] (Figura 5.7.b). La Figura 5.8 muestra que las células tienen la capacidad de adherirse y crecer, incluso en placas no tratadas. Ante bajas concentraciones de Ca^{+2} , las células no se pegan a la superficie, pero si forman agregados. Esto sugiere que proliferación del cultivo es dependiente de adherencia y la presencia de calcio [64] y por lo tanto no es factible utilizar este medio de cultivo para llevar las células a suspensión.

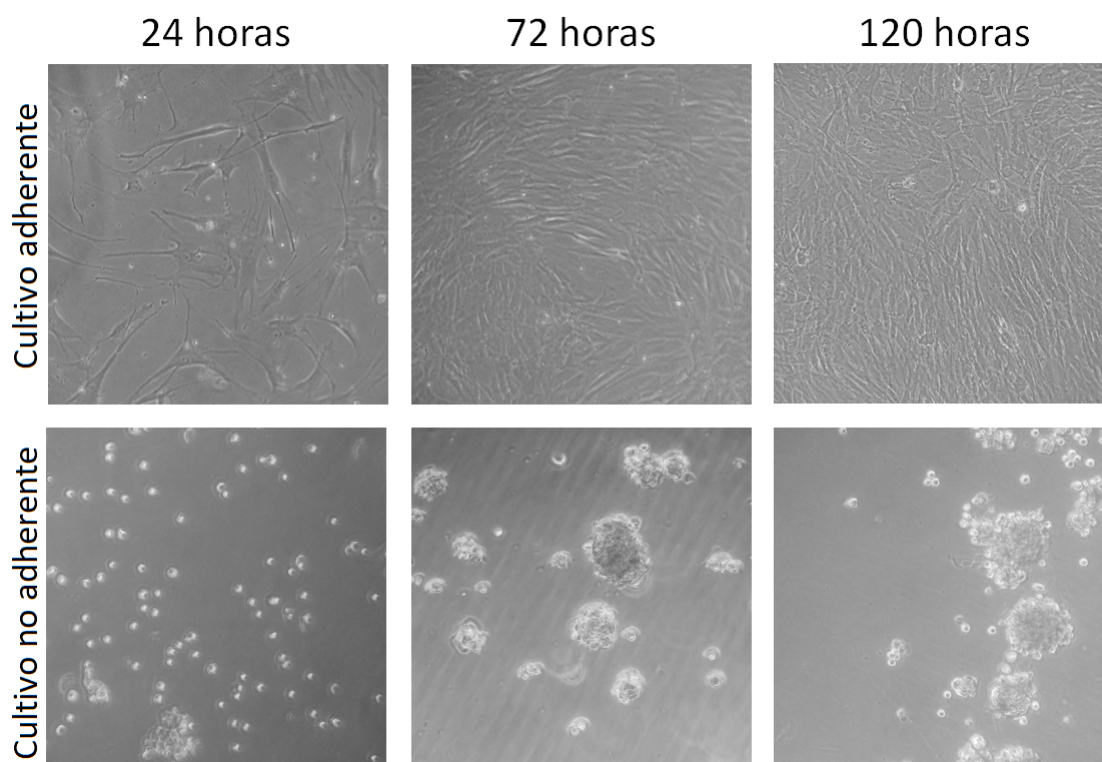


Figura 5.8: Comparación de la evolución del cultivo en α -MEM y quelado con 2 mM de EGTA en placas adherente y no adherentes

5.2.2. Surfactantes

Antes de llevar las células a suspensión, es necesario encontrar un polímero, de baja toxicidad, que pueda proteger a las células de los esfuerzos de corte generados por la agitación del cultivo. En la Tabla 5.4 se muestra la densidad celular, luego de 15 días de cultivo con distintas concentraciones de pluronic F68 y PEG 8000.

Tabla 5.4: Concentración final de células para cultivo de hASC para distintas concentraciones de surfactantes

	Surfactante en medio de cultivo	Densidad celular final [$\times 10^6$ cell/ml]	Viabilidad
Control		$0,11 \pm 0,0042$	94 %
Pluronic F68	0,01 % p/v	$0,09 \pm 0,0064$	92 %
	0,1 % p/v	$0,07 \pm 0,0028$	91 %
	0,2 % p/v	$0,07 \pm 0,0039$	91 %
PEG 8000	0,1 % v/v	$0,12 \pm 0,0014$	96 %
	1 % v/v	$0,14 \pm 0,0046$	96 %
	2 % v/v	$0,15 \pm 0,0046$	95 %

Para el pluronic muestra una reducción entre 18% y un 36% en la biomasa total, lo cual indica que el polímero podría tener un efecto tóxico sobre las células, sin embargo, la viabilidad se mantiene sobre el 90%. En la literatura no se ha demostrado que el pluronic 68 tenga un efecto citotóxico sobre las células mesenquimales, pero si se encuentra reportado que promueve la diferenciación celular [76]. Por ende, puede que parte del cultivo está en estado de diferenciación prematura, lo cual explica la disminución de la proliferación. Por otra parte el PEG muestra un aumento de hasta un 36% en la proliferación, manteniendo la viabilidad del cultivo, por lo que preliminarmente es la mejor opción para llevar las células a suspensión.

5.2.3. Cultivo en esferoides

Para evaluar el potencial de proliferación de las células en esferoides, se preparó una solución de células a una densidad $0,5 \cdot 10^6$ [cel/ml], la cual se agitó a 50 rpm para generar agregados espontáneamente y simultáneamente permitir la migración de las células, sin dañarlas y de este modo pudiesen formar nuevas estructuras. En la Figura 5.9 se ve el registro de avance en la formación esferoides y en la Figura 5.10, el crecimiento y viabilidad del cultivo.

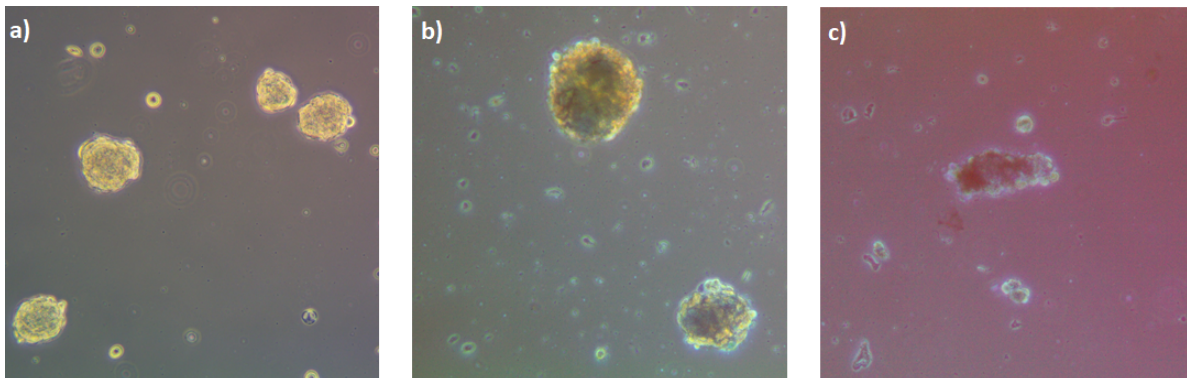


Figura 5.9: Seguimiento del avance del cultivo en esferoides a) 24 horas b) 72 horas c) 120 horas

Durante las primeras 24 horas, se forman pequeños agregados entre 15-20 células (Figura 5.9.a) y se pierde cerca del 25% del cultivo, producto de los esfuerzos de corte generados por la agitación. Sin embargo, la viabilidad se mantiene sobre el 90%, por lo que el cultivo tiene buenas posibilidades de sobrevivencia. A medida que avanza el cultivo, se observa que aumenta el tamaño de los agregados (Figura 5.9.b), pero no por efecto de la proliferación, ya que esta decae continuamente, al igual que la viabilidad. Igualmente, los esferoides presentan zonas necróticas y un aumento en las células muertas en suspensión. Finalmente, luego de 120 horas de experimentación, se descarta el cultivo, ya que la densidad es menor a $0,1 \cdot 10^6$ [cel/ml] y la viabilidad está por debajo del 70%. Los agregados generados (Figura 5.9.c) están necróticos casi en su totalidad y no tienen forma compacta, lo cual indica que se están disgregando.

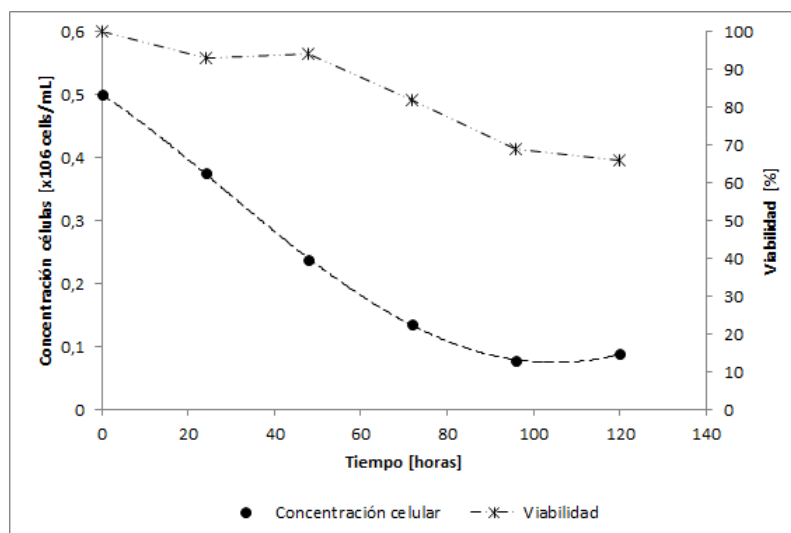


Figura 5.10: Curva de crecimiento para cultivo en esferoides

El resultado de la experiencia puede atribuirse a variables físicas y bioquímicas. Un factor importante para crecer las células en un cultivo en suspensión, es el patrón de agitación. En condiciones ideales el flujo turbulento debería poder limitar la formación de agregados y reducir al mínimo el daño celular por esfuerzos mecánicos, limitando la liberación de factores apoptóticos. En este sentido, los *spinner* equipados con *impeller* de 8 aspas [77] o con forma de péndulo [78, 79] a bajas revoluciones, han demostrado tener mejor desempeño en comparación con otro tipo de configuraciones. Por otra parte, las células mesenquimales activan una ruta de muerte programada ante la pérdida de adhesión celular [64], por lo que este tipo de cultivos son usualmente suplementados con un inhibidores de ROCK, para impedir la activación de esta vía [77-79]. Preliminarmente esto indicaría que no es posible expandir las células por medio de esferoides, pues no se cuentan con las condiciones necesarias, pero no se descarta la posibilidad de futuros estudios.

5.2.4. Cultivo en microcarrier

Una de las alternativas para propagar las células de forma adherente y al mismo tiempo tener un sistema escalable, es a través del uso de microcarrier. SoloHill Collagen y Cytodex 3 son dos opciones disponibles en el mercado utilizados para propagar todo tipo de células mesenquimales humanas. Poseen una superficie sólida (SoloHill) y microporosa (Cytodex), de modo que las células crecen en la superficie exterior en forma de monocapa, lo cual facilita el suministro de nutrientes y oxígeno, además de la cosecha de las células [27]. Por otra parte, la cubierta de colágeno crea un microambiente natural, el cual promueve la adhesión y proliferación celular [80]. Si bien, se encuentra reportado que el dextrano entrega una mejor eficiencia de pegado en comparación con el poliestireno [29], no hay evidencia concluyente respecto al efecto de estas matrices sobre la expansión [28].

A diferencia de otros tipos de microcarriers, ambos tipos a pequeña escala han demostrado propagar las células en múltiples pasajes, manteniendo sus propiedades terapéuticas [28, 81], ser plataformas escalables añadiendo nuevos microcarriers o aumentando el volumen del reactor y permitiendo cosechar las células de forma sencilla [29, 82]. Los resultados más relevantes se resumen en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5: Parámetros de cultivo para crecimiento en microcarriers

Microcarrier	SoloHill	Cytodex 3
Máxima biomasa[10^6 cel/mL]	0,25	0,37
μ_{\max} [h^{-1}]	0,012	0,013
τ_d	55 horas	55 horas
$\Delta L/\Delta G$	1,30	1,64

El cultivo utilizando SoloHill microcarriers tuvo una duración total de 240 horas, alcanzado una concentración máxima de $0,25 \cdot 10^6$ [cel/ml] y un tiempo de duplicación de 55 horas (Figura 5.11), mientras que el cultivo con Cytodex 3 tuvo una duración de 264 horas, llegando a una concentración máxima de $0,37 \cdot 10^6$ [cel/ml] y un tiempo de duplicación de 55 horas (Figura 5.12). En términos generales, los parámetros para el cultivo en suspensión difieren del cultivo adherente tanto para la velocidad de crecimiento, como para el estado metabólico (Tabla 5.5 y 5.3), pero son similares a lo reportado sobre cultivo de células madre en microcarriers [83].

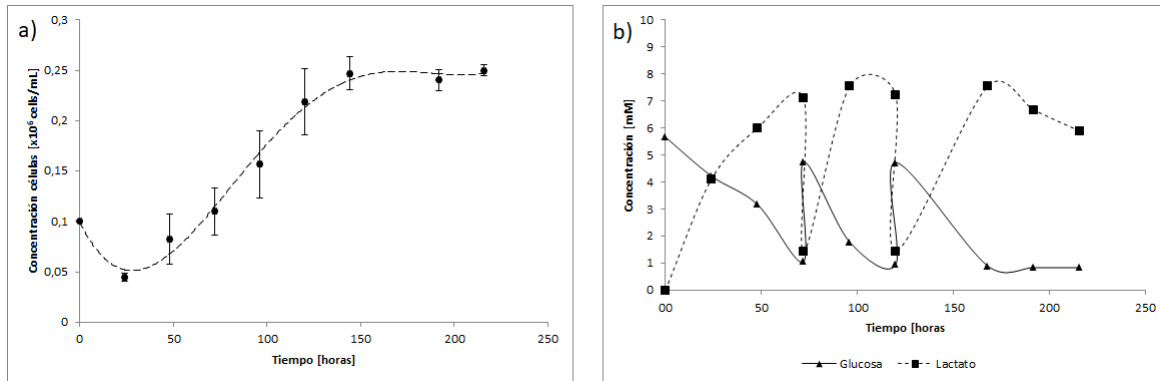


Figura 5.11: Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo en suspensión en SoloHill microcarrier. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato

En ambos casos, durante las primeras 12 horas se llevó a cabo la etapa de adherencia. Para el cultivo en SoloHill se logró un 40 % de eficiencia, pero no fue posible establecer la distribución de las células en la superficie, ya que los microcarriers son brillantes al microscopio. En el cultivo con Cytodex 3, se logró una eficiencia de pegado del 78 %, con una distribución homogénea entre 2 a 3 células por microcarrier (Figura 5.13).

En el cultivo en microcarrier Cytodex, la glucosa no bajó de los 2 mM de glucosa y el lactato no superó los 6 mM, lo que da un $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,64$ (Figura 5.12.b). Por su parte,

el cultivo en SoloHill muestra una variación entre 5,5 y 0,5 mM de glucosa, mientras que el lactato está entre 7 y 1 mM, estimando un $\Delta Lac/\Delta Glc = 1,31$ (Figura 5.11.b). Los valores están dentro de valores normales, pero como se mencionó anteriormente, son mayores a los obtenidos en el cultivo adherente lo que podría explicar el aumento en el tiempo de duplicación. La diferencia en la razón $\Delta Lac/\Delta Glc$, se puede deber a que el cultivo en Cytodex fue reacondicionado diariamente con medio fresco, mientras que el SoloHill se alimentó cada 3 días, lo que causó en este último un *shift* metabólico hacia el final del cultivo, pues se observa en la Figura 5.11.b que las células consumen el lactato a consecuencia de la ausencia de glucosa.

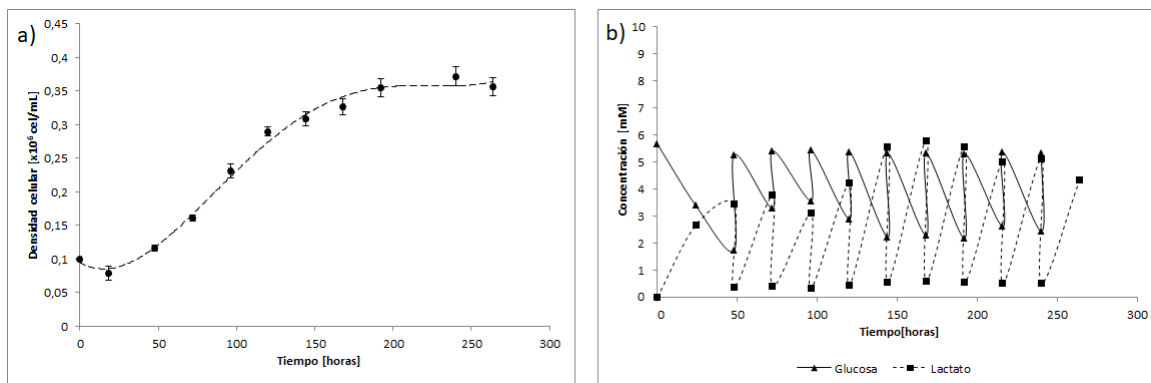


Figura 5.12: Curva de crecimiento y metabolitos para cultivo en suspensión en Cytodex 3 microcarrier. a) Densidad celular y viabilidad. b) Consumo de glucosa y producción de lactato

A diferencia del cultivo de esferoides, este método logró expandir la población celular. El cultivo en Cytodex logró una biomasa total comparable al del cultivo adherente con α -MEM AntiOX y es casi un 50 % mayor al cultivo en SoloHill. A priori, los microcarrier Cytodex serían los más adecuados, por lo que las etapas de recuperación y diferenciación se realizaron en base a este cultivo. No obstante, se debe tener en cuenta que la superficie en solución es 4 veces mayor a la utilizada en los microcarriers SoloHill, por lo que la concentración de células por cm^2 es mayor en este último. De acuerdo con el fabricante, es posible realizar cultivos de alta densidad con los microcarrier Cytodex, llegando a 20 g/L [84], lo cual multiplicaría 2,5 veces el área disponible. En el caso, de los microcarrier SoloHill, la gran parte de los trabajos utilizan la concentración recomendada [53] [28], por lo que se podría evaluar su desempeño de sistema en alta densidad.

Un aspecto interesante es que a pesar de que ambos microcarriers tienen el mismo tipo de recubrimiento (colágeno), muestran un desempeño muy diferente durante el cultivo. Esto sugiere que las características del núcleo, como la forma, el tamaño, la densidad de la perla, la rigidez y la porosidad, afectan tanto la adherencia como el crecimiento de las células. Por ejemplo, las células cultivadas en microcarriers sólidos pueden sufrir daños por efecto de la agitación, los esfuerzos de corte y la colisión entre partículas [80].

A medida que avanza el cultivo, el registro muestra que los microcarriers comienzan formar agregados, producto de la adherencia de las células (Figura 5.13). Esto reduce el área disponible para el crecimiento y ocurre en los microcarriers Cytodex en menor medida que en

los SoloHill. Esto es un problema común en las superficies recubiertas en colágeno, ya que debido a sus características biocompatibles, forma estructuras fibrosas y promueve la adhesión celular [85]. Regular la agitación del cultivo, es una manera de solucionar este problema, pero bajo ciertas limitaciones. Una alta agitación provocaría grandes esfuerzos de corte, lo cual evitaría que las células migren de un microcarrier a otro e inducir muerte celular por efecto del estrés. Por otra parte, una baja agitación podría provocar la sedimentación y agregación de los microcarrier, disminuyendo la transferencia de oxígeno y nutrientes, tal como en los esferoides [86].

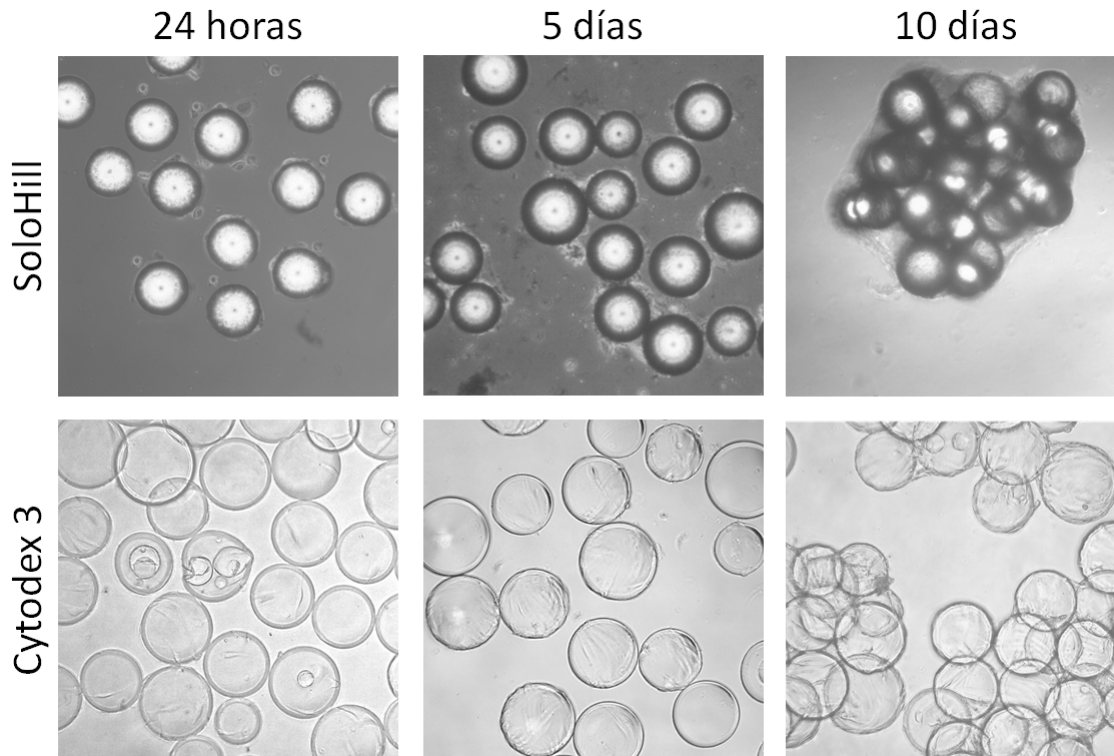


Figura 5.13: Seguimiento del avance del cultivo en SoloHill y Cytodex 3 microcarriers

Uno de las principales desventajas de expandir las células en este tipo de superficie, es que el colágeno es un compuesto de origen animal. Cytodex 1 es una opción *xeno-free* de microcarrier, con propiedades similares al Cytodex 3, salvo que carece de cubierta y el núcleo tiene carga positiva. Este producto ha demostrado tener alta eficiencia en la adhesión celular y es capaz de propagar cultivos de células madre de larga duración, sin alterar el potencial de diferenciación [29, 30]. Además de esto, existen sustratos en base a componentes de origen humano, con los cuales se puede recubrir los microcarriers y así mejorar la fijación y la expansión de las células [87].

Para la etapa de recuperación, se utilizaron dos métodos enzimáticos para separar las células de los microcarrier; TrypLE, un análogo de la tripsina, comúnmente utilizado para disociar stem cells y colagenasa tipo I 0,05 % la cual degrada la cubierta de colágeno tipo I de los microcarrier. Como resultado, la colagenasa tuvo una baja eficiencia de recuperación, la cual alcanza un máximo de 69 % luego de una hora. Mientras que en el caso de la digestión

con TrypLE se cosechó el 89% después de 30 minutos (Figura 5.14). En ambos casos se registró una viabilidad sobre el 95%. Si bien se podría acelerar la recuperación con colagenasa aumentando su concentración en solución, sería bastante costoso. El valor por de esta enzima por unidad de volumen es 5 veces mayor que la del TrypLE [88]. Por lo tanto, el análogo de tripsina, es un método más efectivo y rentable.

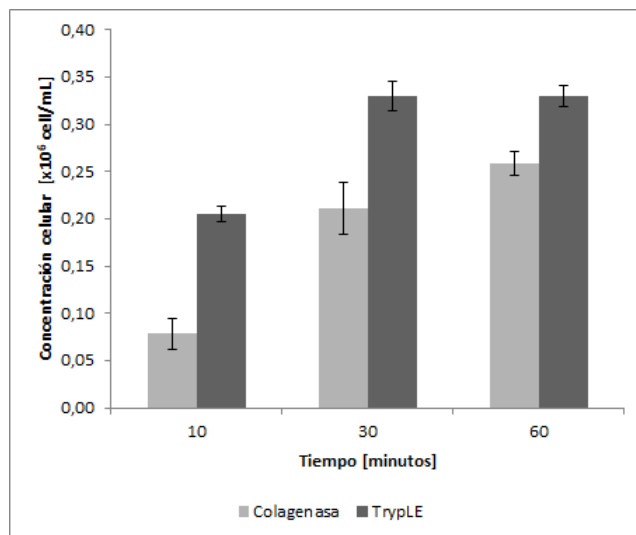


Figura 5.14: Recuperación celular para tratamiento con colagenasa tipo I y TrypLE

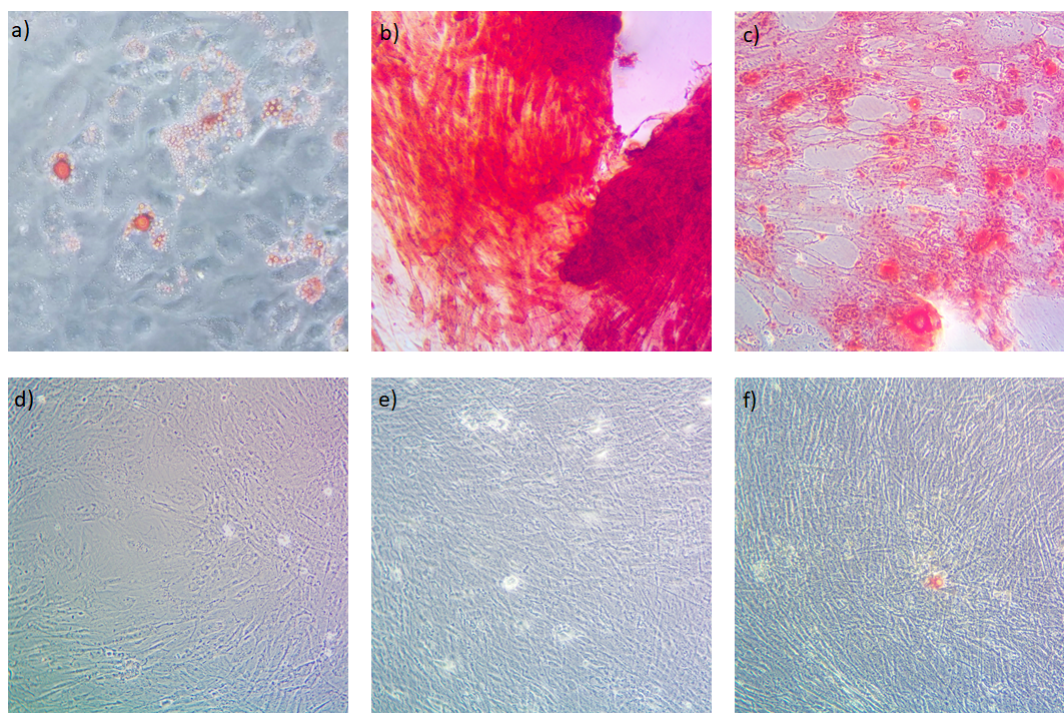


Figura 5.15: Ensayo de diferenciación a) Adipogénico, b) Condrogénico, c) Osteogénico, d) - f) Controles

Las células recuperadas desde este último cultivo, se sembraron para realizar ensayo de

diferenciación, demostrando mantener propiedades adherentes y el potencial para diferenciarse a 3 linajes. Después de 8 días, la diferenciación adipogénica formó adiposomas (Figura 5.15.a). Los cultivos de control, no fueron capaces de retener la tinción, debido a la falta de ácidos grasos (Figura 5.15.d). Para la diferenciación condrogénica, se obtuvo una tinción positiva con safranina luego de 15 días (Figura 5.15.b), debido a la abundancia de glucosaminoglucanos, los cuales no se encuentran presentes en los controles (Figura 5.15.e). La diferenciación osteogénica, finaliza luego de 21 días de cultivo. La tinción con alizarin red, muestra la mineralización y la formación de depósitos de calcio (Figura 5.15.c), los cuales están en menor medida en las células no diferenciadas (Figura 5.15.f).

Adicionalmente, se midieron los marcadores de superficie a las células cosechadas del cultivo. La Tabla 5.6 se construyó en base al histograma que se encuentra en el Anexo. Estas células, no expresaron los marcadores CD45 y CD34, mientras que CD90, CD105, CD44 y CD73 fueron positivos. Los resultados no presentan diferencias significativas con el cultivo adherente (Tabla 5.2).

Tabla 5.6: Expresión de marcadores de superficie en células hASC expandidas en microcarriers

Marcador	Células positivas [%]
CD45 FITC	4,73
CD34 PE	2,55
CD90 FITC	98,75
CD105 PE	99,44
CD44 FITC	96,92
CD73 PE	98,48

Como se puede ver, no fue posible medir todos los marcadores, debido a que no se contaba con suficientes muestra, por lo que se seleccionaron los más importantes. Una forma alternativa de caracterizar a población de hASC es con el panel negativo para CD34, CD45 y positivo para CD73, CD90, CD105, CD44 y CD29[89]. Los marcadores CD73, CD90, CD105 están presentes y son marcadores generales de las células madre, CD44 y CD29 son marcadores adherentes y la presencia de CD44 verificaría esta característica, CD34 y CD45 son marcadores hematopoyéticos, su ausencia señala que las células no están en proceso de diferenciación. De acuerdo al criterio de la ISCT, faltaría comprobar marcadores MHC (HLA-DR), pero en base los marcadores medidos las células poseen el fenotipo hASC. Por otra parte, a nivel clínico se utilizan células mesenquimales que cumplan con la expresión de CD90, D105, D45 y que puedan diferenciarse a los tres linajes característicos [90], por lo que las células además serían aptas para terapia celular.

5.3. Propuesta de escalamiento

Tomando en cuenta que la principal limitante que tiene el cultivo sigue siendo la superficie, la forma de natural de escalar el cultivo es aumentando la cantidad de microcarriers en el

sistema. Sin embargo, es importante mantener constante la concentración para así evitar la formación de agregados, lo que se puede lograr aumentando el volumen de cultivo al aumentar la cantidad de microcarriers. Hay autores que sugieren que el régimen óptimo de alimentación, es añadiendo un 30 % de superficie cada 3 días [29], pero sería necesario ajustarlo para este tipo de células, pues como se mostró en el cultivo con SoloHill, la glucosa se agota bajo este régimen y se compromete el estado metabólico. Por otra parte, se encuentra reportado que las células, además de proliferar sobre una misma superficie, tienen la capacidad de migrar de un microcarrier a otro, reduciendo la necesidad de manipulación de las células y el riesgo de contaminación [85, 91].

Una de las claves para lograr una transferencia exitosa del cultivo adherente en placas al cultivo en microcarriers, es lograr mantener tasas de crecimiento y un estado metabólico similar entre ambos tipos de cultivo, ya que esto afectará la cantidad de células que se puede producir por unidad de tiempo y por ende la cantidad de tiempo que debe esperar un paciente para recibir tratamiento. Como se mencionó anteriormente, los cultivos suplementados con FBS muestran un aumento importante en el tiempo de duplicación, de 31 horas. En contraste, el lisado de plaquetas ha demostrado ser más efectivo en el proceso de transferencia del cultivo a suspensión. De acuerdo con la literatura, es capaz de mantener las tasas de proliferación, si presentar diferencias significativas [92], por lo que sería importante comprobarlo.

Adicionalmente, está reportado que el perfil de consumo de aminoácidos presenta diferencia significativas en adherencia y suspensión [66], por lo que propone optimizar el medio de cultivo por medio de análisis de flujo metabólico (MFA). Esta herramienta permite estimar los flujos metabólicos y dilucidar algunos mecanismos celulares [93]. Estableciendo la síntesis de biomasa, además de las tasas específicas de consumo y producción de glucosa, lactato, amonio y aminoácidos (esenciales y no esenciales), se podría construir un modelo simplificado del metabolismo central del carbono de estas células y con esto, diseñar un medio de cultivo que se ajuste a los requerimientos celulares y estimule la proliferación.

Una de las posibles estrategias para poder expandir las células, es aislar las células mesenquimales, desde el tejido adiposo y subcultivarlas hasta que alcancen una concentración para inocular un *spinner* entre $0,10 - 0,20 \cdot 10^6$ [cel/ml]. Desde aquí se puede aumentar progresivamente el volumen del cultivo, hasta alcanzar un total de $1 - 10 \cdot 10^9$ células. En las condiciones actuales, para el cultivo en microcarrier Cytodex suplementado con suero bovino fetal, se necesitarían entre 2,7 y 27 litros de cultivo para poder tratar a un paciente. Por otra parte, si se lograra corroborar la mantención de los parámetros cinéticos de lisado de plaquetas, se reduciría a un cultivo entre 1,9 y 19 litros. En este punto sería importante evaluar además de la cantidad de células, el estado de senescencia del cultivo, porque las células tienden a perder sus características terapéuticas luego de sucesivos pasajes.

Conclusión

La caracterización del cultivo adherente mostró que no era factible llevar directamente el cultivo a suspensión debido a que el tiempo de duplicación era cercano a 9 días y la biomasa producida no era suficiente para realizar pruebas en suspensión. Para optimizar el crecimiento del cultivo adherente se testearon 5 medios de cultivo. El estudio mostró que las células debían ser alimentadas con un medio bajo en glucosa, ya que la alta disponibilidad de azúcar tiene un efecto negativo la tasa de proliferación. La presencia de nucleósidos parece ser un factor importante en el crecimiento, al igual que la concentración aminoácidos. Sin embargo no fue posible determinar el perfil óptimo, por lo que sugiere realizar un estudio de consumo y producción de aminoácidos. Por otra parte, se estableció que las células son sensibles al estrés oxidativo y el efectos adversos se pueden reducir agregando antioxidantes, ya que aún no es posible regular la presión parcial de oxígeno. El medio α -MEM suplementado con una mezcla de antioxidantes mostró el mejor desempeño. El tiempo de duplicación se redujo a 23 horas, la biomasa alcanzó un máximo de $0,38 \cdot 10^6$ [cel/ml], un 316,66 % más que la condición basal y también se mostró una mejora en el estado metabólico. Las células cultivadas en este medio cumplen con la expresión marcadores de membrana mínimos establecidos por la ISCT.

En cuanto al uso de surfactantes, las células mostraron una disminución en la biomasa total el utilizar Pluronic F68. Para el PEG8000 se observó una buena tolerancia, por lo que se utilizó para proteger a las células de los esfuerzos de corte en el cultivo en suspensión. Por otra parte, el uso de medios libres de calcio, permiten la formación de agregados en placas no adherentes pero no su crecimiento. Esto indica que las células son dependientes de calcio y anclaje para su expansión.

Dentro de las metodologías de adaptación a suspensión, no fue posible proliferar el cultivo en esferoides. Las células tienden a formar agregados de células con núcleos necróticos, cuya viabilidad decae en el tiempo. Esto se atribuye principalmente a la pérdida de adherencia y a los esfuerzos de corte generados por la agitación. Antes de descartar esta alternativa de cultivo, se podrían realizar pruebas suplementado el cultivo con algún inhibidor de la apoptosis o cambiando la configuración del *spinner*, agregando aspas al *impeller*.

Por otra parte, se logró expandir las células en suspensión mediante el uso de microcarriers. Se probaron dos tipos disponibles en el mercado: SoloHill y Cytodex 3, en ambos casos el tiempo de duplicación aumento a 55 horas y los parámetros cambiaron negativamente respecto al cultivo adherente. Si bien ambas superficies presentan cubierta de colágeno, los microcarrier Cytodex tuvieron una mejor eficiencia de pegado (75 %) en contraste con los SoloHill que solo llegaron a un 40 %, lo indica que el material del núcleo también afecta

el desarrollo del cultivo. Luego de 10 días de cultivo, los microcarrier Cytodex alcanzaron una biomasa similar al cultivo en placa ($0,37 \cdot 10^6$ [cel/ml]) por lo que seleccionó como el sistema de expansión de las células. Sin embargo, se plantea la necesidad de estudiar el uso de microcarrier SoloHill a una mayor densidad, ya que bajo las instrucciones del fabricante la superficie en cultivo es una 4 parte de la que se utiliza con los Cytodex, pero la biomasa final es solo un 50% menor.

Durante la etapa de cosecha, el TrypLE mostró ser un método mas eficiente y barato para separar las células de los microcarriers, recuperando el 89% de las células en 30 minutos. El cultivo resultante mostró propiedades adherentes, se diferenció a los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico, además de tener los marcadores inmunofenotípicos adecuados. Por lo tanto, tanto el sistema como el medio de cultivo son adecuados para la propagación de las células.

Tomando en cuenta que las células serán ocupadas en terapia celular, se necesitan buscar alternativas *xeno-free* tanto para lo microcarriers como para el suero. En particular, este último, puede ser reemplazado por lisado de plaquetas humano. En cultivo adherente, mostró el mejor desempeño de todas las propuestas de medio de cultivo tanto en la proliferación, como en el estado metabólico. Dicho esto, se hace necesario verificar la mantención de los parámetros de cultivo en el proceso de transferencia de las células a suspensión.

Los resultados presentados permiten diseñar preliminarmente un sistema en suspensión. A diferencia del cultivo adherente, este método tiene la ventaja de ser escalable, pero la principal limitante continúa siendo la superficie disponible. La alternativa más simple de escalamiento es aumentar el volumen de alimentación, manteniendo la concentración de microcarriers en cultivo. En base a esto, actualmente se necesitarían entre 2,7 y 27 litros de cultivo, desde células madres recuperadas de lipoaspirado, para poder realizar algún tipo de aplicación terapéutica. En trabajos futuros se pueden estudiar regímenes de alimentación y factores senescentes con el fin de optimizar la producción de las células.

El desarrollo de un proceso estandarizado de expansión en un corto periodo de tiempo, es fundamental en la producción clínica de células mesenquimales para su uso en terapias seguras y eficientes. En este contexto, si bien este trabajo tuvo un carácter exploratorio, permitió mejorar los parámetros de crecimiento, reducir significativamente los tiempos de expansión, aumentar la productividad y entregar directrices en el escalamiento del cultivo. Los resultados son prometedores e indican que es posible satisfacer los requerimientos para realizar de terapia celular, por lo que se podría evaluar potencial terapéutico de las células o incluso aplicar este sistema en la expansión de otros tipos de células madre.

Bibliografía

- [1] Ronnda L Bartel. “Stem Cells and Cell Therapy: Autologous Cell Manufacturing”. En: *Translational Regenerative Medicine*. Elsevier, 2015, págs. 107-112.
- [2] Ali Golchin y Tahereh Zarnoosheh Farahany. “Biological Products: Cellular Therapy and FDA Approved Products”. En: *Stem Cell Reviews and Reports* (2019), págs. 1-10.
- [3] Rona S Weinberg. “Overview of Cellular Therapy”. En: *Transfusion Medicine and Hemostasis*. Elsevier, 2019, págs. 505-512.
- [4] Birgit Weyand y col. *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application II*. Springer, 2013.
- [5] GA Pimentel-Parra y B Murcia-Ordoñez. “Células madre, una nueva alternativa médica”. En: *Perinatología y Reproducción Humana* 31.1 (2017), págs. 28-33.
- [6] Sean I Savitz y Kaushik Parsha. “Enhancing Stroke Recovery with Cellular Therapies”. En: *Stroke*. Elsevier, 2016, págs. 981-991.
- [7] MLBK Dominici y col. “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement”. En: *Cytotherapy* 8.4 (2006), págs. 315-317.
- [8] Anna Bajek y col. “Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies”. En: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 64.6 (2016), págs. 443-454.
- [9] Laura Frese, Petra E Dijkman y Simon P Hoerstrup. “Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine”. En: *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 43.4 (2016), págs. 268-274.
- [10] Lina Badimon, Blanca Oñate y Gemma Vilahur. “Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isquémica coronaria”. En: *Revista Española de Cardiología* 68.7 (2015), págs. 599-611.
- [11] Philippe Bourin y col. “Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)”. En: *Cytotherapy* 15.6 (2013), págs. 641-648.
- [12] Vasileios Karantalis y Joshua M Hare. “Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease”. En: *Circulation research* 116.8 (2015), págs. 1413-1430.
- [13] Rosalinda Madonna, Yong-Jian Geng y Raffaele De Caterina. “Adipose tissue-derived stem cells: characterization and potential for cardiovascular repair”. En: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29.11 (2009), págs. 1723-1729.
- [14] Patrick C Baer y Helmut Geiger. “Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity”. En: *Stem cells international* 2012 (2012).

- [15] John K Fraser y col. “Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology”. En: *Trends in biotechnology* 24.4 (2006), págs. 150-154.
- [16] Gary M Pigeau, Elizabeth Csaszar y Aaron Dulgar-Tulloch. “Commercial scale manufacturing of allogeneic cell therapy”. En: *Frontiers in medicine* 5 (2018).
- [17] Hiroshi Mizuno, Morikuni Tobita y A Cagri Uysal. “Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine”. En: *Stem cells* 30.5 (2012), págs. 804-810.
- [18] Krishna M Panchalingam y col. “Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review”. En: *Stem cell research & therapy* 6.1 (2015), pág. 225.
- [19] Sébastien Sart y col. “Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications”. En: *Tissue Engineering Part B: Reviews* 20.5 (2013), págs. 365-380.
- [20] Corning. *Cell Expansion*. [en línea]. URL: <https://www.corning.com/california/products/life-sciences/applications/bioprocess-applications/cell-expansion.html> (visitado 14-08-2019).
- [21] Christina Kropp, Diana Massai y Robert Zweigerdt. “Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells”. En: *Process Biochemistry* 59 (2017), págs. 244-254.
- [22] Raja Vadivelu y col. “Microfluidic technology for the generation of cell spheroids and their applications”. En: *Micromachines* 8.4 (2017), pág. 94.
- [23] Zoe Cesarz y Kenichi Tamama. “Spheroid culture of mesenchymal stem cells”. En: *Stem cells international* 2016 (2016).
- [24] Dominik Egger y col. “Dynamic cultivation of mesenchymal stem cell aggregates”. En: *Bioengineering* 5.2 (2018), pág. 48.
- [25] Ruei-Zhen Lin y Hwan-You Chang. “Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research”. En: *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* 3.9-10 (2008), págs. 1172-1184.
- [26] Christina McKee y G Rasul Chaudhry. “Advances and challenges in stem cell culture”. En: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 159 (2017), págs. 62-77.
- [27] SM Badenes y col. “Microcarrier Culture Systems for Stem Cell Manufacturing”. En: *Stem Cell Manufacturing*. Elsevier, 2016, págs. 77-104.
- [28] Qasim A Rafiq y col. “Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors”. En: *Biotechnology journal* 11.4 (2016), págs. 473-486.
- [29] D Schop y col. “Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism”. En: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 4.2 (2010), págs. 131-140.
- [30] Allen Kuan-Liang Chen y col. “Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells”. En: *Stem cell research* 7.2 (2011), págs. 97-111.
- [31] Jennifer L Weber, Jeffery J Scibek y Jessica L Martin. “Next-Gen Microcarrier Advances Cell Therapy: System Enables Improved Scale Up”. En: *Genetic Engineering & Biotechnology News* 38.2 (2018), págs. 20-20.
- [32] Li-Yi Sun y col. “Functional cells cultured on microcarriers for use in regenerative medicine research”. En: *Cell transplantation* 20.1 (2011), págs. 49-62.

- [33] Zhanqiu Yang y Hai-Rong Xiong. “Culture conditions and types of growth media for mammalian cells”. En: *Biomedical Tissue Culture*. IntechOpen, 2012.
- [34] Meenakshi Arora. “Cell culture media: A review”. En: *Mater methods* 3.175 (2013), pág. 24.
- [35] Tatsuma Yao y Yuta Asayama. “Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues”. En: *Reproductive medicine and biology* 16.2 (2017), págs. 99-117.
- [36] Zhen Arthur Lu y col. *The effect of extracellular calcium on cellular adhesion of mesenchymal stem cells to substrates*. 2011.
- [37] Pablo Caviedes y col. *Methods for cell therapy*. US Patent 8,252,279. Ago. de 2012.
- [38] PC Caldwell. “Calcium chelation and buffers”. En: *A Symposium on Calcium and Cellular Function*. Springer. 1970, págs. 10-16.
- [39] Francesca Ferraro y col. “Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function”. En: *Science translational medicine* 3.104 (2011), 104ra101-104ra101.
- [40] J Van der Valk y col. “Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods”. En: *Toxicology in vitro* 24.4 (2010), págs. 1053-1063.
- [41] S Radtke y col. “Platelet lysates and their role in cell therapy”. En: *ISBT Science Series* 9.1 (2014), págs. 193-197.
- [42] ME Bernardo y col. “Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute”. En: *Journal of cellular physiology* 211.1 (2007), págs. 121-130.
- [43] Giuseppe Astori y col. “Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future”. En: *Stem cell research & therapy* 7.1 (2016), pág. 93.
- [44] D John Betteridge. “What is oxidative stress?” En: *Metabolism* 49.2 (2000), págs. 3-8.
- [45] Yijun Liu y Teng Ma. “Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application”. En: *Biotechnology progress* 31.2 (2015), págs. 468-481.
- [46] Ahmed Mohyeldin, Tomás Garzón-Muvdi y Alfredo Quiñones-Hinojosa. “Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche”. En: *Cell stem cell* 7.2 (2010), págs. 150-161.
- [47] Barry Halliwell. “Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls”. En: *Biomedical journal* 37.3 (2014), pág. 99.
- [48] Ziomara P Gerdtzen. “Medium Design, Culture Management, and the PAT Initiative”. En: *Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions* 2 (2017), pág. 8.
- [49] Koichi Fujisawa y col. “Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells”. En: *Stem cell research & therapy* 9.1 (2018), pág. 93.
- [50] Ju S Kornienko y col. “High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells”. En: *Scientific reports* 9 (2019).
- [51] Sara Shaban y col. “Effects of antioxidant supplements on the survival and differentiation of stem cells”. En: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017 (2017).
- [52] David W Murhammer y Charles F Goochee. “Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection”. En: *Biotechnology progress* 6.5 (1990), págs. 391-397.
- [53] Khandaker Siddiquee y Ma Sha. “Large-scale production of human mesenchymal stem cells in BioBLU® 5c single-use vessels”. En: *Appl Note* 334 (2014), págs. 1-11.

- [54] Tristan Lawson y col. "Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50 L single-use stirred tank bioreactor". En: *Biochemical engineering journal* 120 (2017), págs. 49-62.
- [55] Yasushi Shintani, Keiji Iwamoto y Kazuaki Kitano. "Polyethylene glycols for promoting the growth of mammalian cells". En: *Applied microbiology and biotechnology* 27.5-6 (1988), págs. 533-537.
- [56] Nicholas D Evans, Eileen Gentleman y Julia M Polak. "Scaffolds for stem cells". En: *Materials Today* 9.12 (2006), págs. 26-33.
- [57] James D Michaels y col. "Interfacial properties of cell culture media with cell-protecting additives". En: *Biotechnology and bioengineering* 47.4 (1995), págs. 420-430.
- [58] Saradaprasan Muduli y col. "Stem cell culture on polyvinyl alcohol hydrogels having different elasticity and immobilized with ECM-derived oligopeptides". En: *Journal of Polymer Engineering* 37.7 (2017), págs. 647-660.
- [59] Wonjae Lee y Jon Park. "3D patterned stem cell differentiation using thermo-responsive methylcellulose hydrogel molds". En: *Scientific reports* 6 (2016), pág. 29408.
- [60] Deborah Schop y col. "Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells". En: *Tissue Engineering Part A* 15.8 (2009), págs. 1877-1886.
- [61] Katie F Wlaschin y Wei-Shou Hu. "Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding". En: *Cell Culture Engineering*. Springer, 2006, págs. 43-74.
- [62] Esteban Andrés González Echeverría. "Optimización de la Expansión in Vitro de Células Mesenquimales de Tejido Lipoaspirado: el primer paso hacia la terapia celular miocárdica". En: (2016).
- [63] HE Gruber y col. "Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence". En: *Biotechnic & Histochemistry* 87.4 (2012), págs. 303-311.
- [64] Seahyoung Lee y col. "Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: a prerequisite for cell therapy". En: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015 (2015).
- [65] Najmaldin Saki y col. "Adverse effect of high glucose concentration on stem cell therapy". En: *International journal of hematology-oncology and stem cell research* 7.3 (2013), pág. 34.
- [66] Gustavo A Higuera y col. "Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells". En: *Tissue Engineering Part A* 18.5-6 (2011), págs. 654-664.
- [67] Fernando Rodríguez-Serrano y col. "Promotion of human adipose-derived stem cell proliferation mediated by exogenous nucleosides". En: *Cell biology international* 34.9 (2010), págs. 917-924.
- [68] LB Buravkova y col. "Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we?" En: *Mitochondrion* 19 (2014), págs. 105-112.
- [69] MG Valorani y col. "Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials". En: *Cell Proliferation* 45.3 (2012), págs. 225-238.
- [70] Diana Legzdina y col. "Characterization of senescence of culture-expanded human adipose-derived mesenchymal stem cells". En: *International journal of stem cells* 9.1 (2016), pág. 124.
- [71] Hatim Hemed, Bernd Giebel y Wolfgang Wagner. "Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells". En: *Cytotherapy* 16.2 (2014), págs. 170-180.

- [72] Valentina Becherucci y col. “Human platelet lysate in mesenchymal stromal cell expansion according to a GMP grade protocol: a cell factory experience”. En: *Stem cell research & therapy* 9.1 (2018), pág. 124.
- [73] Waleephan Tanchaon y col. “Human platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum for culture and endothelial differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells”. En: *Molecular medicine reports* 19.6 (2019), págs. 5123-5132.
- [74] Sangeetha Kandoi y col. “Evaluation of platelet lysate as a substitute for FBS in explant and enzymatic isolation methods of human umbilical cord MSCs”. En: *Scientific reports* 8.1 (2018), pág. 12439.
- [75] Universidad de Stanford. *Ca-EGTA Calculator v1.2*. [en línea]. URL: <https://web.stanford.edu/~cpatton/CaEGTA> (visitado 23-07-2019).
- [76] Ayşegül Doğan y col. “Differentiation of human stem cells is promoted by amphiphilic pluronic block copolymers”. En: *International journal of nanomedicine* 7 (2012), pág. 4849.
- [77] Ruth Olmer y col. “Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors”. En: *Tissue Engineering Part C: Methods* 18.10 (2012), págs. 772-784.
- [78] Ying Wang y col. “Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions”. En: *Stem cell research* 11.3 (2013), págs. 1103-1116.
- [79] Harmeet Singh y col. “Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells”. En: *Stem cell research* 4.3 (2010), págs. 165-179.
- [80] Bingyan Li y col. “Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering”. En: *Journal of orthopaedic translation* 3.2 (2015), págs. 51-57.
- [81] Mark Szczyepka y col. “Single-use bioreactors and microcarriers”. En: *Bioprocess International* 12 (2014), págs. 54-68.
- [82] Alvin W Nienow y col. “A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers”. En: *Biochemical Engineering Journal* 85 (2014), págs. 79-88.
- [83] Gemma Eibes y col. “Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system”. En: *Journal of biotechnology* 146.4 (2010), págs. 194-197.
- [84] GE Healthcare. *CytodexTM surface microcarriers*. [en línea]. URL: https://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/18106061_cytodex.pdf (visitado 23-07-2019).
- [85] Jasmin Leber y col. “Microcarrier choice and bead-to-bead transfer for human mesenchymal stem cells in serum-containing and chemically defined media”. En: *Process Biochemistry* 59 (2017), págs. 255-265.
- [86] Iori Takahashi y col. “Effects of agitation rate on aggregation during beads-to-beads subcultivation of microcarrier culture of human mesenchymal stem cells”. En: *Cyotechnology* 69.3 (2017), págs. 503-509.
- [87] Allen Kuan-Liang Chen, Shaul Reuveny y Steve Kah Weng Oh. “Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction”. En: *Biotechnology advances* 31.7 (2013), págs. 1032-1046.
- [88] Kunikazu Tsuji y col. “Effects of different cell-detaching methods on the viability and cell surface antigen expression of synovial mesenchymal stem cells”. En: *Cell transplantation* 26.6 (2017), págs. 1089-1102.
- [89] Gang Yu y col. “Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes”. En: *Cytotherapy* 12.4 (2010), págs. 538-546.

- [90] Arthur A Nery y col. “Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications”. En: *Cytometry Part A* 83.1 (2013), págs. 48-61.
- [91] Qasim A Rafiq y col. “Qualitative and quantitative demonstration of bead-to-bead transfer with bone marrow-derived human mesenchymal stem cells on microcarriers: Utilising the phenomenon to improve culture performance”. En: *Biochemical engineering journal* 135 (2018), págs. 11-21.
- [92] Thomas RJ Heathman y col. “Scalability and process transfer of mesenchymal stromal cell production from monolayer to microcarrier culture using human platelet lysate”. En: *Cytotherapy* 18.4 (2016), págs. 523-535.
- [93] Matthew Jerums y Xiaoming Yang. “Optimization of cell culture media”. En: *BioProcess Int* 3.6 (2005), págs. 38-44.

.1. Composición medios de cultivo

Tabla 7: Composición medios de cultivo DMEM, DME-M/F12 y α - MEM (Gibco)

Componentes	DMEM [g/L]	DMEM/F12 [g/L]	α - MEM [g/L]
Sales Inorgánicas			
CaCl ₂	0,2	0,116	0,2
CuSO ₄ · 5H ₂ O	-	0,0000013	-
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0,0001	0,00005	-
FeSO ₄ · 7H ₂ O	-	0,000417	-
MgCl ₂ · 4H ₂ O	-	0,02864	-
MgSO ₄	0,09767	0,04884	0,09767
KCl	0,4	0,3118	0,4
NaCl	6,4	6,996	6,8
Na ₂ HPO ₄	-	0,07102	-
NaH ₂ PO ₄	0,109	0,0543	0,122
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	-	0,000432	-
Aminoácidos			
L - Ácido Aspártico	-	0,00665	0,03
L - Ácido Glutámico	-	0,00735	0,075
L - Alanina	-	0,00445	0,025
L - Arginina	0,084	0,1475	0,105
L - Asparagina · H ₂ O	-	0,0075	0,05
L - Cisteína · 2HCl	0,063	0,03129	0,0313
L - Cisteína · HCl · H ₂ O	-	0,01756	0,1
L - Fenilalanina	0,066	0,03548	0,032
Glicina	0,03	0,01875	0,05
L - Glutamina	0,584	0,365	0,292
L - Histidina	0,042	0,03148	0,042
L - Isoleucina	0,105	0,05447	0,052
L - Leucina	0,105	0,05905	0,052
L - Lisina · HCl	0,146	0,09125	0,0725
L - Metionina	0,03	0,01724	0,015
L - Prolina	-	0,01725	0,04
L - Serina	0,042	0,02625	0,025
L - Tirosina · 2Na · 2H ₂ O	0,104	0,05579	0,0519
L - Treonina	0,095	0,05345	0,048
L - Triptofano	0,016	0,00902	0,01
L - Valina	0,094	0,05285	0,046
Vitaminas			
Ácido ascórbico	-	-	0,05
Ácido fólico	0,004	0,00265	0,001
D - Ácido pantoténico	0,004	0,00224	0,001
D - Biotina	-	0,0000035	0,0001

Tabla 7: Composición medios de cultivo DMEM, DME-
M/F12 y α - MEM (Gibco)

Componentes	DMEM [g/L]	DMEM/F12 [g/L]	α - MEM [g/L]
Cloruro de colina	0,004	0,00898	0,001
Mioinositol	0,0072	0,0126	0,002
Niacinamida	0,004	0,00202	0,001
Piridoxal · HCl	-	-	0,001
Piridoxina · HCl	0,004	0,002031	-
Riblofavina	0,0004	0,000219	0,0001
Tiamina · HCl	0,004	0,00217	0,001
Vitamina B12	-	0,00068	0,00136
Otros			
Ácido linoleico	-	0,000042	-
Ácido lipoico	-	0,000105	0,0002
Ácido pirúvico · Na	0,11	0,055	0,11
Adenosina	-	-	0,01
Citidina	-	-	0,01
2'- Deoxiadenosina	-	-	0,01
2'- Deoxicitidina · HCl	-	-	0,011
2'- Deoxiguanosina	-	-	0,01
Guanosina	-	-	0,01
Hipoxantina	-	0,0024	-
Putrascina	-	0,000081	-
Timidina	-	0,000365	0,01
Uridina	-	-	0,01

.2. Citometría de flujo

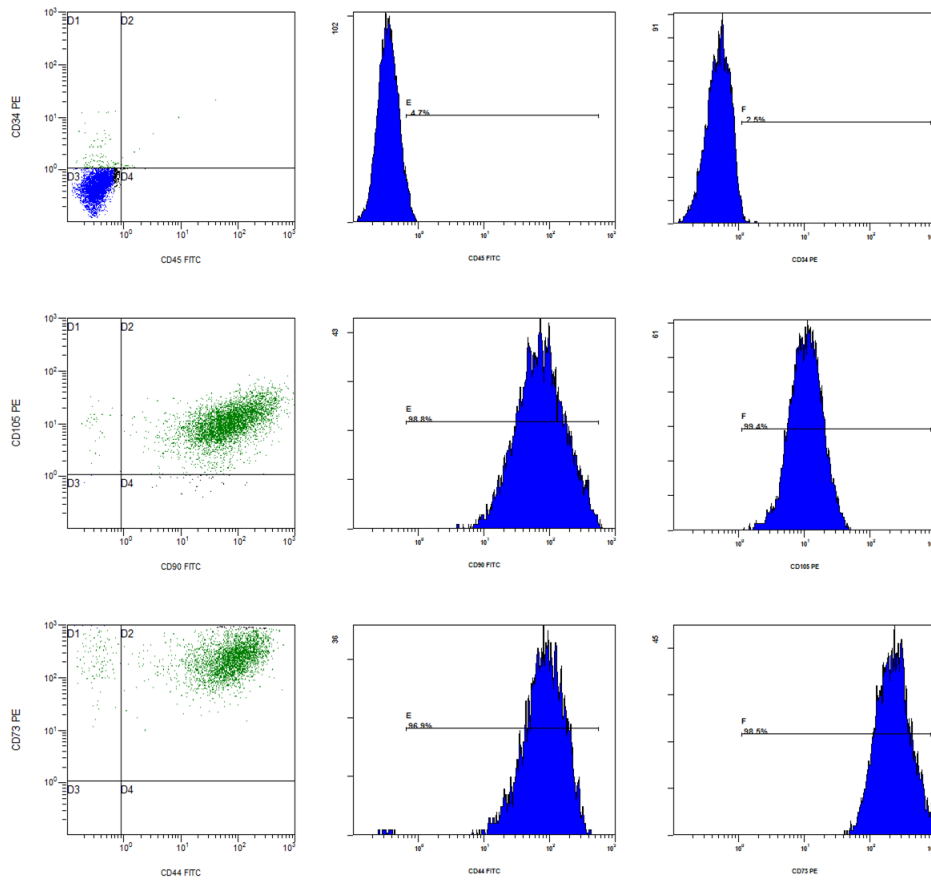


Figura 16: Histograma de citometría de flujo para cultivo en microcarrier Cytodex 3

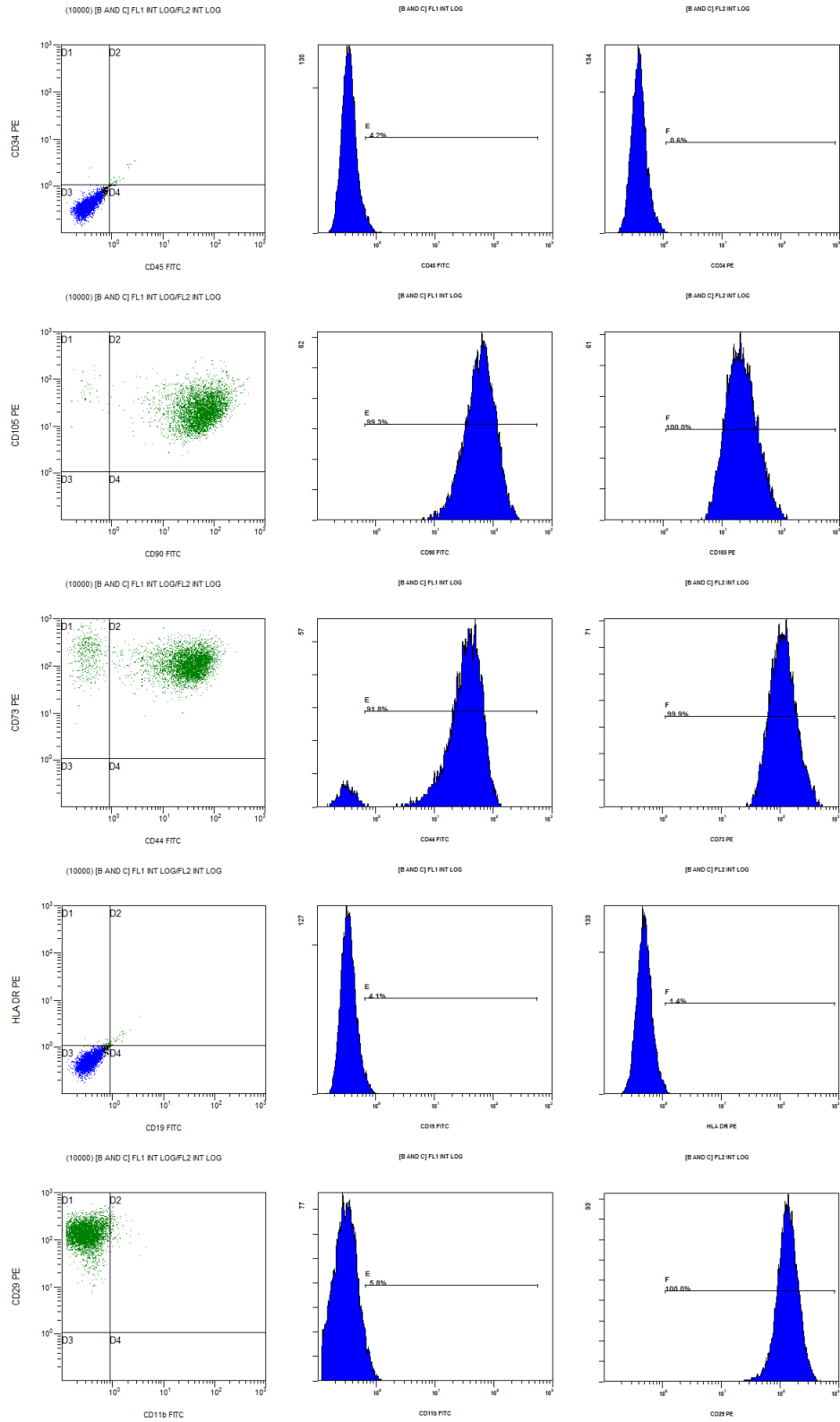


Figura 17: Histograma de citometría de flujo para cultivo adherente en α -MEM AntiOX