



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

OBTENCIÓN, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE
PROVENIENTES DE TEJIDO ADIPOSO Y GELATINA DE WHARTON PARA USO
EN TERAPIA CELULAR EN CASOS DE INSUFICIENCIA OVÁRICA PREMATURA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

JORGE ANDRÉS ROJAS PINO

PROFESOR GUÍA:
JUAN ASENJO DE LEUZE D

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BÁRBARA ANDREWS FARROW
ANAMARÍA SÁNCHEZ DAZA
PABLO CAVIEDES FERNÁNDEZ

SANTIAGO DE CHILE
2021

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: JORGE ANDRÉS ROJAS PINO
FECHA: 2021
PROF. GUÍA: JUAN ASENJO DE LEUZE D

OBTENCIÓN, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE
PROVENIENTES DE TEJIDO ADIPOSO Y GELATINA DE WHARTON PARA USO
EN TERAPIA CELULAR EN CASOS DE INSUFICIENCIA OVÁRICA PREMATURA

La insuficiencia ovárica prematura es una condición en donde los ovarios dejan de funcionar normalmente antes de los 40 años, la cual genera problemas asociados a la reducción de estrógenos y progesterona. Los tratamientos actuales no se centran en la reversión de la condición, más bien en atacar las consecuencias de ésta.

Se propone el uso de terapia celular como tratamiento para la condición mencionada, la cual consiste en la inyección intraovárica de células madre para sustituir la función de células cuya función se encuentra dañada. Así, un buen candidato para la terapia celular, son las células mesenquimales aisladas de la gelatina de Wharton (Wharton's Jelly-Mesenchymal Stem Cells, WJ-MSCs), dado que este tipo de células tiene un alto potencial diferenciativo, baja antigenicidad, y dado que provienen de cordón umbilical, son de fácil recolección.

El objetivo del proyecto es el desarrollo de protocolos para optimizar la expansión y producción de un banco de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton. Para esto se extraen células madre de la gelatina de Wharton utilizando una metodología de explantes. Estas células son utilizadas para verificar la factibilidad de su crecimiento en suspensión utilizando microcarriers Cytodex[®]1 en un Spinner Flask.

Estas células en el cultivo realizado presentan, para su fase de crecimiento exponencial, una tasa de crecimiento máxima $\mu_{max} = 0,021[h^{-1}]$ y un tiempo de duplicación de $t_d = 32,86[h]$. Se calcula igualmente para el cultivo los moles de lactato producidos por mol de glucosa consumidos, conocido como rendimiento glucosa/lactato. Para la fase de crecimiento exponencial del cultivo se obtiene un rendimiento de 2,39, lo cual indica que las células utilizan la fermentación láctica como principal método para producir energía.

Se compara el comportamiento de estas células con el comportamiento de células madre provenientes de tejido adiposo (ADCs) cultivadas en placas y en suspensión. Para el cultivo de WJ-MSCs en microcarriers se obtienen tiempos de duplicación 1,2 veces mayor que para el cultivo de ADCs en placas, mostrando que el cultivo eficiente de WJ-MSCs en microcarriers es posible.

Por otra parte, se estudia el potencial de adherencia y diferenciación para las células provenientes del cultivo en suspensión. Se comprueba que mantienen la capacidad de adherencia, y se obtienen resultados positivos para la diferenciación condrogénica y osteogénica, pero negativos para la adipogénica.

A mis padres, por siempre apoyarme en las buenas y en las malas.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. La Insuficiencia Ovárica Prematura (POI)	1
1.2. Terapia Celular	2
1.3. Células Madre	2
1.3.1. Embrionarias	3
1.3.2. Pluripotentes Inducidas	3
1.3.3. Mesenquimales	3
2. Objetivos	5
2.1. General	5
2.2. Específicos	5
2.3. Limitaciones	5
3. Marco Teórico	6
3.1. Uso de Células Madre en terapia celular como tratamiento para la POI	6
3.2. Expansión de células madre	7
3.2.1. Obtención	7
3.2.2. Placas Adherentes	7
3.2.3. Cultivo en suspensión con Microcarriers - Spinner Flasks	7
3.2.4. Cultivo en suspensión con Microcarriers - Matraz Erlenmeyer	8
3.2.5. Consideraciones clave para el cultivo en microcarriers	9
3.3. Medio de cultivo	9
3.3.1. Tipos de Medio	10
3.3.2. Composición del Medio de cultivo	10
3.4. Eficiencia en la producción de energía de las células	12
3.5. Métodos de conteo celular para cultivo en microcarriers	12
4. Materiales y Método	13
4.1. Materiales	13
4.1.1. Reactivos	13
4.1.2. Equipos	13
4.1.3. Material de Laboratorio	14
4.2. Método	14
4.2.1. Preparación del medio de cultivo alpha-MEM suplementado con anti-oxidantes	14
4.2.2. Obtención de WJ-MSCs	15

4.2.3.	Obtención de ADSCs	15
4.2.4.	Conservación de las células: Criopreservación	16
4.2.5.	Conteo celular	16
4.2.6.	Cultivo en placas adherentes	18
4.2.7.	Cultivo en suspensión	19
4.2.8.	Caracterización del Cultivo	22
5.	Resultados y discusión	24
5.1.	Calibración del método de medición de la densidad celular por fluorescencia .	24
5.1.1.	Curva de fluorescencia: Cytodex [®] 1	24
5.1.2.	Curva de fluorescencia: Cytodex 3	27
5.1.3.	Sobre el método de conteo por fluorescencia	30
5.2.	Crecimiento celular en placas - ADCs	32
5.2.1.	Primera Instancia	32
5.2.2.	Segunda instancia	35
5.3.	Crecimiento celular en suspensión	38
5.3.1.	Cultivos A, B y C: ADCs en Spinner Flasks	38
5.3.2.	Cultivo D: ADCs en Matraz de Erlenmeyer	43
5.3.3.	Cultivo E: WJ-MSCs en Spinner Flask	46
5.3.4.	Comparación entre cultivos	50
5.4.	Potencial de diferenciación	52
5.5.	Sobre el estudio de marcadores	53
	Conclusiones	54
	Anexo	62
5.6.	Anexo A	62

Índice de Tablas

3.1. Algunos de los microcarriers presentes en el mercado.	8
4.1. Condiciones para la diferenciación de las células provenientes de gelatina de Wharton.	23

Índice de Ilustraciones

5.1. Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs a distintas concentraciones según el tiempo.	24
5.2. Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs a distintas concentraciones según el tiempo en presencia de microcarriers Cytodex [®] 1.	25
5.3. Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs en el tiempo según la concentración.	25
5.4. Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs en el tiempo según la concentración en presencia de microcarriers Cytodex [®] 1.	26
5.5. Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs a los 5 minutos de comenzada la reacción de Presto Blue [™] HS. La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) se muestran en la imagen.	27
5.6. Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs en presencia de microcarriers Cytodex [®] 1 a los 5 minutos de comenzada la reacción de Presto Blue [™] HS. La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) se muestran en la imagen.	27
5.7. Fluorescencia de ADSCs a distintas concentraciones según el tiempo.	28
5.8. Fluorescencia de ADSCs a distintas concentraciones según el tiempo en presencia de microcarriers Cytodex [®] 3.	28
5.9. Fluorescencia de ADSCs en el tiempo según la concentración.	29
5.10. Fluorescencia de ADSCs en el tiempo según la concentración en presencia de microcarriers Cytodex [®] 3. La leyenda muestra los diversos tiempos de medición en minutos.	29
5.11. Fluorescencia de ADSCs a los 5 minutos de comenzada la reacción de Presto Blue [™] HSs. La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) se muestran en la imagen.	30
5.12. Fluorescencia de ADSCs en presencia de microcarriers Cytodex [®] 3 a los 5 minutos de comenzada la reacción de Presto Blue [™] HS. La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) se muestran en la imagen.	30
5.13. Cantidad de células totales y densidad celular en las placas de cultivo según el tiempo para la primera instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.	32
5.14. Concentración de glucosa y lactato en las placas según el tiempo para la primera instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.	33
5.15. Consumo y producción de glucosa y lactato en las placas según los rangos de tiempo para la primera instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.	34

5.16. Rendimiento de lactato/glucosa en las placas según los rangos tiempo para la primera instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.	34
5.17. Cantidad de células totales y densidad celular en las placas de cultivo según el tiempo para la segunda instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.	35
5.18. Concentración de glucosa y lactato en las placas según el tiempo para la segunda instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.	36
5.19. Consumo y producción de glucosa y lactato en las placas según los rangos de tiempo para la segunda instancia de medición del crecimiento en placas adherentes. Un valor negativo muestra consumo del compuesto, mientras que positivo producción.	36
5.20. Rendimiento de lactato/glucosa en las placas según los rangos de tiempo para la segunda instancia de medición del crecimiento en placas adherentes. El valor del rendimiento para el rango 91-98[h] es de 42.	37
5.21. Densidad celular en el Cultivo A según el tiempo transcurrido.	38
5.22. Cantidad de células totales Cultivo A según el tiempo transcurrido.	38
5.23. Densidad celular en el Cultivo B según el tiempo transcurrido.	39
5.24. Cantidad de células totales en el Cultivo B según el tiempo transcurrido. . .	39
5.25. Densidad celular en el Cultivo C según el tiempo transcurrido.	41
5.26. Cantidad de células totales en el Cultivo C según el tiempo transcurrido. . .	41
5.27. Concentración de glucosa y lactato, en mM, presente en el Cultivo C según avanza el tiempo.	42
5.28. Consumo y producción de glucosa y lactato según los rangos de tiempo para el Cultivo C.	42
5.29. Rendimiento de lactato/glucosa en las placas según los rangos tiempo para el cultivo C.	43
5.30. Densidad celular en el cultivo en matraz según el tiempo transcurrido.	43
5.31. Cantidad de células totales en el cultivo en matraz según el tiempo transcurrido.	44
5.32. Concentración de glucosa y lactato, en mM, presente en el cultivo en matraz acorde al tiempo.	45
5.33. Consumo y producción de glucosa y lactato según los rangos de tiempo para el cultivo en matraz.	45
5.34. Rendimiento de lactato/glucosa según los rangos de tiempo para el cultivo en matraz.	46
5.35. Densidad celular en el cultivo de WJ-MSCs según el tiempo transcurrido. . .	47
5.36. Cantidad de células totales en el cultivo de WJ-MSCs según el tiempo transcurrido.	47
5.37. Concentración de glucosa y lactato, en mM, presente en el cultivo de WJ-MSCs acorde al tiempo.	49
5.38. Consumo y producción de glucosa y lactato según los rangos de tiempo para el cultivo E.	49
5.39. Rendimiento de lactato/glucosa según los rangos de tiempo para el cultivo E.	50
5.40. Resultados diferenciación de WJ-MSCs.	52

Capítulo 1

Introducción

1.1. La Insuficiencia Ovárica Prematura (POI)

La insuficiencia ovárica prematura (POI, por sus siglas en inglés) es, según la definición de *U.S. National Library of Medicine* [1], una condición en donde los ovarios dejan de funcionar normalmente antes de los 40 años. Específicamente, consiste en la ausencia de la menstruación por seis meses en una persona menor a 40 años que ha menstruado previamente, junto con un aumento de las hormonas estimulante folicular (FSH; más de 20 UI/L) y luteinizante (LH), junto a la disminución de estrógenos [2]. esta condición afecta alrededor de una de cada 100 mujeres menores de 40 años [2].

Esta condición suele confundirse con la menopausia prematura, en donde la función ovárica se detiene por completo, sin embargo, al hablar de POI aún se pueden presentar menstruaciones ocasionales y hasta embarazo. Normalmente no es posible verificar las causas de esta condición en los pacientes, pero se sabe que esta es consecuencia del agotamiento de los folículos ováricos o disfunción de los mismos por la alteración del del mecanismo de maduración, problemas que se pueden asociar a: desordenes metabólicos, desordenes genéticos, enfermedades autoinmunes, quimioterapia o radioterapia, toxinas (como el humo del tabaco), o un bajo número de folículos ováricos [1].

Los principales problemas asociados a esta condición son la disminución de la producción de estrógenos y progesterona, tal como se mencionó anteriormente, manifestándose en forma de bochornos, sudores nocturnos, irritabilidad, falta de concentración, disminución del deseo sexual, dolor durante las relaciones sexuales, sequedad vaginal, además aumentando el riesgo de sufrir otras afecciones como ansiedad, depresión, enfermedades al corazón, infertilidad, hipotiroidismo, osteoporosis, entre otras [3].

Los tratamientos para esta condición se centran en el remplazo de las hormonas y consumo de suplementos alimenticios, junto con tratamientos para las posibles enfermedades asociadas [4], sin embargo, esto no revierte la condición de los pacientes, solo disminuye los síntomas presentados.

Ante lo anterior, se propone como nuevo tratamiento la inyección intraovárica de célu-

las mesenquimales aisladas de la gelatina de Wharton (Wharton's Jelly-Mesenchymal Stem Cells, WJ-MSCs) con intención de optimizar el reclutamiento de folículos existentes para desencadenar la maduración de ovocitos. Este nuevo tratamiento tendría enfoque en la condición y no en sus síntomas.

1.2. Terapia Celular

La terapia celular consiste en el trasplante de células a un órgano receptor para sustituir la función de células cuya función se encuentra dañada, con objetivo de restaurar la función normal. Este trasplante puede ser a modo de inyección, implante o injerto [5].

Para reemplazar tejidos en degeneración, el organismo actúa de dos maneras diferentes. La primera es por la diferenciación de nuevas células a partir de células precursoras. La segunda corresponde a la proliferación de células ya diferenciadas. Actualmente se cree que existen células primordiales en la mayor parte de los tejidos de un humano adulto, pero al mismo tiempo, los estímulos que las activan son escasos [6].

Cuando las enfermedades o lesiones que alteran la función celular son demasiado graves para ser corregidas por los mecanismos de auto reparación del organismo es factible aplicar terapia celular. Para esto es necesario escoger el tipo de célula a utilizar según el tipo de lesión y la función que deberá cumplir. También es posible trasplantar células con la intención que estas secreten ciertas sustancias con efectos locales o sistémicos. Es normal que se utilicen células con capacidad de diferenciación para poder desempeñar las funciones que le pide su entorno, o bien células ya previamente diferenciadas. Por lo general se utilizan células madre para el tratamiento [6].

Algunas aplicaciones de esta técnica son en tratamientos para ciertos tipos de cáncer, algunas enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Parkinson, la Esclerosis lateral amiotrófica, daños al cordón espinal y diabetes [7].

1.3. Células Madre

Las células madre son células no especializadas con gran habilidad para renovarse, capaces de diferenciarse, en lo morfológico y en lo funcional, en uno o más tipos de células especializadas. Por lo anterior, forman un rol importante en la homeostasis y regeneración de tejido [8].

Cuando se necesita de su acción, la célula madre procede a dividirse, formando una célula madre hija y una célula progenitora. La célula progenitora es una célula intermediaria que luego se convierte en una célula diferenciada [9].

Según su origen estas pueden ser categorizadas como células madre embrionarias (Embryonic stem cells, ESCs), pluripotentes inducidas o células postnatales/adultas/mesenquimales (Adult Stem Cells, ASCs).

1.3.1. Embrionarias

Son células provenientes del desarrollo embrionario, específicamente en los primeros 3 a 5 días de vida, los cuales pueden ser obtenidos mediante fertilización *in vitro*. Su principal ventaja es que pueden especializarse en cualquier tipo de célula adulta. Su uso es controversial por la utilización de embriones humanos [10].

1.3.2. Pluripotentes Inducidas

Las células pluripotentes inducidas son células adultas modificadas por distintos medios (físicos, químicos, virales o una combinación de estos) para generar células con las características de las madres, entre ellas la diferenciación en diversas líneas celulares. En la actualidad el principal problema de la utilización de estas células en terapia celular es la alta probabilidad de formación de teratomas, por lo que su uso aún se encuentra restringido [11].

1.3.3. Mesenquimales

Las células madre mesenquimales o adultas multipotentes (MSCs, por sus siglas en inglés), son células madre que pueden diferenciarse a diversos tipos celulares. Su nombre es tal debido a que estas células son originadas en la capa germinal del mesodermo. Se aislaron por primera vez a partir de médula ósea, pero el día de hoy se pueden obtener de diversos tejidos tales como: tejido adiposo, cordón umbilical, pulmones o tendones. Se ha demostrado que se pueden diferenciar en células como adipocitos, neuronas, hepatocitos, etc [12].

Para poder definir a una célula como célula madre, según la definición de la sociedad internacional por la terapia celular (International Society for Cellular Therapy, ISCT) está debe cumplir con tres características base. La primera, es que estas deben adherirse al plástico en condiciones estándar de cultivo utilizando frascos de cultivo celular. Como segunda condición, más del 95 % de la población debe expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90 mediante la medición por citometría de flujo, mientras que deben expresar en menos de un 2 % CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II. Por último, las células deben poder diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones de diferenciación estándar *in vitro* [13].

Una de las principales fuentes de células madre mesenquimales es la médula ósea (BM-MSCs), sin embargo, el procedimiento se considera muy invasivo y poco eficiente por lo que otras opciones son consideradas [14].

Células mesenquimales provenientes de tejido adiposo (ADSCs)

El tejido adiposo es uno de los más abundantes en el cuerpo humano con un estroma de fácil obtención [15]. La recolección del tejido adiposo es fácil, debido a la concepción de este como algo antiestético o poco saludable, siendo las liposucciones una intervención común en el ámbito de la medicina [16].

En total, se estima que el porcentaje de ADSCs en el tejido adiposo es de entre 0,5 % y 5 % [17].

Las ADSCs tienen respuesta inmuno-regulatoria, lo que las convierte en candidatas para su uso en terapia celular. Los cultivos de estas células son heterogéneos en su fenotipo. No es claro si todas las ADSCs contribuyen de igual manera a los procesos inmunomoduladores [18] [19].

Células mesenquimales provenientes de la gelatina de Wharton (WJ-MSCs)

Este tipo de células provienen del tejido que rodea la vena umbilical y los vasos en el cordón umbilical [20].

Este tipo de células tiene un alto potencial diferenciativo, baja antigenicidad, y son de fácil recolección, presentando menores problemas éticos o legales para ésta. Las WJ-MSCs presentan características similares a las células embrionales, como un bajo tiempo de duplicación y una mejor capacidad expansiva ex-vivo [21].

Capítulo 2

Objetivos

2.1. General

- Desarrollo de protocolos para optimizar la expansión in vitro y producción de un banco de células madre mesenquimales de la jalea de Wharton y proporcionar estudios de prueba de concepto en ratones para el tratamiento de la insuficiencia ovárica prematura basada en una inyección intraovárica de dichas células madre mesenquimales expandidas.

2.2. Específicos

- Probar método de conteo celular por fluorescencia
- Obtener células madre humanas a partir de tejido adiposo y de gelatina de Wharton.
- Caracterizar el crecimiento de células madre proveniente de tejido adiposo en cultivo adherente.
- Estudiar el crecimiento y el metabolismo de producción de energía de las ADSc y WJ-MSCs en cultivos en suspensión.
- Verificar el potencial de diferenciación y adherencia en las WJ-MSCs.

2.3. Limitaciones

El objetivo general del proyecto busca estudiar la aplicación de las células en terapia celular, sin embargo, en este estudio no se realizaron las pruebas de concepto en ratones, más bien el trabajo se centró en la obtención de las células madre de gelatina de Wharton, su cultivo, y potencial de diferenciación tras el mismo.

Los datos obtenidos de las ADCs se utilizarán a modo de comparativa para los resultados obtenidos con las células madre de gelatina de Wharton.

Capítulo 3

Marco Teórico

3.1. Uso de Células Madre en terapia celular como tratamiento para la POI

La terapia celular es estudiada con mayor detalle día tras día, y se ha comprobado que se puede utilizar para la agilización en la curación de heridas [22], tratar con enfermedades neurológicas [23], diabetes tipo I y II [24], entre otros tipos de enfermedades.

De manera más específica, es sabido que una inyección de células madres derivadas de la médula osea (BMDSCs) puede promover el desarrollo folicular en ratones con funciones ováricas reducidas, por lo se cree que esta inyección puede ser una alternativa para la condición relacionada con las funciones disminuidas de los ovarios [25]. Continuando con la idea anterior, en *Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders* [26] se realiza un estudio similar en humanos. En este se logra obtener 5 embarazos en 15 personas con funciones ováricas disminuidas, siendo el principal problema que presenta este estudio que 15 personas no puede ser calificado como una muestra representativa. Por otro lado, se han realizado estudios que concluyen que la aplicación de células madre mesenquimales provenientes de la gelatina de Wharton (WJ-MSCs) es beneficioso para el desarrollo de folículos ováricos [27].

El procedimiento de obtención de médula ósea es invasivo y doloroso para los donantes, por lo que se propone el uso de células madre provenientes de cordones umbilicales, específicamente de la gelatina de Wharton, como tratamiento. Se cree que el cambio de tipo celular puede provocar el mismo efecto, pero con mayor facilidad para la obtención de las células.

3.2. Expansión de células madre

3.2.1. Obtención

3.2.2. Placas Adherentes

La expansión de células se refiere al proceso por el cual éstas se multiplican para posteriormente ser utilizadas con diversos fines. En laboratorio, por lo general, se realiza en Placas Adherentes [28], comúnmente llamadas T-flask, en la cual se agrega el medio de cultivo y los suplementos. Normalmente las células son removidas de las placas, y luego subcultivadas por medios enzimáticos.

Estas placas varían su superficie entre 12,5 y 225 cm^2 , por lo que al requerir más superficie que esta, se debe utilizar más de una placa. Cuando el requerimiento es demasiado alto, se produce un problema de espacio, en especial por la necesidad de mantener las placas dentro de incubadoras. Otro problema del uso de diversas placas, es que cada una debe manejarse de manera individual, incrementando las probabilidades de contaminación junto al tiempo requerido para procesarlas, y entregando resultados menos reproducibles [29].

Para suplir las problemáticas anteriores existen los sistemas multi-bandeja. Estos son placas de gran tamaño, con divisiones que funcionan como superficies adherentes para las células. Esto permite que el sistema completo pueda ser utilizado como una sola unidad, es decir, permitiendo que todas las células puedan ser tratadas (cultivadas o retiradas) al mismo tiempo. Estos sistemas pueden llegar a tener una superficie de 25440 cm^2 .

El uso de placas adherentes, sean los sistemas multi-bandeja o bien T-flasks, tienen desventajas claras. La principal, es la falta de control de las variables clave. Este tipo de sistema dificulta la utilización de sistemas automatizados de control de pH, gases y medio. Otra dificultad que se presenta es la gran cantidad de labor humana requerida para operar estas placas, por lo que una tarea como cambiar el medio de cultivo puede resultar difícil o demorosa.

3.2.3. Cultivo en suspensión con Microcarriers - Spinner Flasks

Otra alternativa es el uso de microcarriers, matrices de soporte que permite el crecimiento de células adherentes en bio-reactores (o spinner flasks en menor escala), el cual se ha establecido como el método más confiable desde el punto de vista del escalamiento [30].

Estos combinan el cultivo monocapa con los beneficios de los cultivos agitados, aumentando el área disponible y logrando alta exposición al medio, mejorando la proliferación. Los microcarriers normalmente son esferas de bajo tamaño (100-300 μm de diámetro), los cuales pueden no tener poros, tener poros de bajo tamaño (microporosos) o bien, poros de un tamaño considerable (macroporosos). Los microcarriers sin poros y microporosos por lo general son constituidos por poliestireno o dextrano, mientras que los macroporosos se componen de celulosa o gelatina [31].

Las células se pueden adherir a la superficie de los microcarriers no porosos o penetrar y adherirse dentro de los microcarriers porosos entregando una mayor superficie [32]. Este es un

sistema escalable que puede ser desarrollado en un biorreactor para así, evitar la manipulación excesiva.

A continuación se presenta la tabla 3.1, la cual muestra algunos microcarriers presentes en el mercado junto a sus características [33–37].

Tabla 3.1: Algunos de los microcarriers presentes en el mercado. Donde $+$ significa una carga positiva y N sin carga.

Microcarrier	Fabricante	Diámetro [μm]	Densidad [g/ml]	Matriz	Recubrimiento	Carga	Porosidad	Superficie [cm^2/g]
Cytodex 1 [33, 37]	GE Healthcare/Amersham Biosciences	140 - 200	1,03	Dextrano	DEAE (Amina terciaria)	+	Microporo	3000
Cytodex 3 [33, 37]	GE Healthcare	120 - 180	1,04	Dextrano	Colágeno de piel de porcino denaturado	N	Microporo	2000
Cytopore 2 [33, 37]	GE HealthCare	200 - 280	1,03	Celulosa de algodón	DEAE (Amina terciaria)	+	Microporo	1100
CultiSpher G [33, 34, 37]	Percell Biolytica (Hyclone) (Thermo Scientific)	130 - 380	1,02-1,04	Gelatina tipo I Porcina	-	N	Macroporo	4000
Cultispher-GL [33, 34, 37]	Percell Biolytica (Thermo Scientific)	130 - 380	1,02-1,04	Gelatina	-	N	Macroporo	4000
PlasticPlus [35, 37]	SoloHill	125 - 212	1,02	Poliestireno	-	+	No poroso	480
ProNectin F (Pro-F 102-L) [35, 37]	SoloHill (Thermo Scientific)	125 - 212	1,02	Poliestireno	Fibronectina recombinante	N	No poroso	480
Hillex [35, 37]	SoloHill	160 - 180	1,11	Dextrano	Trimetil amonio catiónico	+	No poroso	515
RapidCell [37]	MP Biomedical	125 - 212	1,02	Vidrio	-	N		325
Glass [37]	Pall Corporation	125 - 212	1,02	Poliestireno	Vidrio con alto contenido de sílice	N	No poroso	515

La elección de microcarrier depende principalmente del tipo de célula que se utilice, principalmente porque cada célula tiene diferente capacidad de adhesión a las superficies, en consecuencia, distinta capacidad para desprenderse de este mismo. Así, la eficiencia del microcarrier será distinta según el material del microcarrier y su recubrimiento [38].

Cytodex 1

Los microcarriers Cytodex [39, 40] son unos de los más utilizados en cuanto a células animales. Cytodex 1 se compone de una matriz de dextrano con DEAE (N,N-diethylaminoethyl) cargado positivamente fijado en su superficie. Tiene un funcionamiento particularmente bueno en la mayoría de las líneas celulares ya establecidas y para la producción de virus o productos celulares de cultivos de células primarias y cepas de células diploides.

Cytodex 3

Su matriz está compuesta de dextrano, pero se encuentra recubierta por una fina capa de colágeno denaturado, se utiliza principalmente para células que presentan dificultades para ser cultivadas *in vitro* y en particular para células con una morfología similar a las epiteliales. Una de sus grandes ventajas es que, debido a su capa de colágeno, es posible utilizar métodos para separar las células de los microcarriers que sean menos perjudiciales para la misma, manteniendo la integridad de la membrana celular y su viabilidad [39, 40].

3.2.4. Cultivo en suspensión con Microcarriers - Matraz Erlenmeyer

Otra forma de generar cultivos tridimensionales es manteniendo en agitación un matraz. Esta técnica es similar al cultivo en Spinner Flasks, sin embargo, presenta algunas diferencias con el cultivo anteriormente mencionado.

Una de las diferencias es que la agitación se ejecuta de diferente manera. Mientras en los Spinner Flasks ésta se realiza por medio de un rodete presente dentro del reactor, la agitación en matraces es por lo general realizada por el movimiento del sistema completo.

Se ha reportado peores crecimientos celulares en matraz en comparación a los spinner flask para la línea celular CHO [41].

3.2.5. Consideraciones clave para el cultivo en microcarriers

Fase de adherencia

La fase de adherencia en un cultivo en 3 dimensiones es un elemento clave para la eficiencia en el cultivo [42]. La falta de una superficie para la adherencia desencadena un proceso de muerte celular llamado ainokis [43]. Para esto se pueden utilizar tres distintos acercamientos. El primero es uno estático, es decir no se agita cultivo para mejorar el contacto entre microcarriers y células. El segundo es semiestático, en que cual se agita por periodos y luego no se agita por cierta cantidad de tiempo. El tercero es de agitación continua.

La determinación de una fase de adherencia óptima dependerá de todas las condiciones del cultivo, como el bio-reactor utilizado, volumen de cultivo, entre otras [42].

Agitación

Las colisiones entre microcarriers pueden provocar la formación de agregados, los cuales aumentan la heterogeneidad del cultivo. Estos agregados afectan de forma negativa en al reproducibilidad del conteo celular, además de poder reducir la viabilidad del cultivo debido a la mala transferencia de nutrientes al interior de estos. Para evitar la formación de agregados es necesario mantener una agitación correcta, la cual debe ser lo suficientemente alta para asegurar que todos los microcarriers se encuentran en suspensión y distanciados entre ellos, pero lo suficientemente baja para no afectar negativamente a las células [42].

Alimentación

Entre los diferentes modos de alimentación se encuentran el batch, continuo, fed-batch y semi-continuo. En el sistema batch, después de inoculado el cultivo no se vuelve a alimentar. En un sistema continuo, se retira medio del cultivo constantemente, mientras se agrega la misma cantidad. En un cultivo fed-batch se agregan nutrientes y medio fresco cada ciertos intervalos de tiempo, pero no se retira medio del cultivo. En un cultivo semi-continuo se retira medio viejo cada ciertos intervalos de tiempo, y se agrega medio fresco.

El sistema semi-continuo es el preferido en el cultivo de células madre mesenquimales humanas, debido a que reduce el uso de medio de cultivo, evitando el agotamiento de los nutrientes [42].

3.3. Medio de cultivo

Para poder realizar un cultivo exitoso *in vitro* se debe mantener una serie de condiciones clave, como la agitación, la presión parcial de oxígeno y también el medio de cultivo.

3.3.1. Tipos de Medio

El medio de cultivo es uno de los componentes esenciales en un cultivo, es el que provee los nutrientes para recrear el ambiente de cultivo original. En general un grupo de componentes son necesarios para el crecimiento en diversas líneas celulares, sin embargo, se pueden diseñar medios que se enfoquen en guiar el cultivo para que exprese una característica en específico, como por ejemplo, la producción de un metabolito.

Es posible encontrar diferentes medios previamente formulados distribuidos de forma comercial. El medio mínimo esencial alpha (α -MEM por sus siglas en inglés) es utilizado para el cultivo de células de mamíferos [44, 45]. Este es una variación del medio MEM (Minimum essential medium) se encuentra suplementado con los componentes esenciales para la proliferación de células L de ratón y células HeLa. Incluye aminoácidos esenciales y no esenciales, más una variedad de vitaminas.

El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) es uno de los más utilizados para el cultivo de células de mamíferos, habiendo sido utilizado en cultivos de neuronas, células de músculo liso, entre otras [44–46]. Su composición contiene unas cuatro veces más vitaminas y aminoácidos y entre dos y cuatro veces más glucosa que otros medios MEM. Este medio se puede categorizar en el tipo de alta glucosa (4,5 g/L de glucosa) y de baja glucosa (1 g/L de glucosa).

El medio 5A de McCoy es una variación del medio basal 5A. Se ha utilizado para cultivos primarios de diferentes orígenes, como médula ósea, riñón de ratón, piel, entre otros [45, 46].

Las composiciones de estos tres medios se encuentran en el Anexo A 5.6

Se ha reportado que el uso de α -MEM suplementado con antioxidantes (α -MEM antiox.) en cultivos de ADCs provoca una mejora en los tiempos de duplicación, mayor cantidad de biomasa y mejoras en el estado metabólico en comparación a α -MEM sin suplementar y al medio DMEM [47].

3.3.2. Composición del Medio de cultivo

Sistemas tampón

El pH es un elemento importante para mantener en operación el cultivo. Los sistemas tampón permiten la regulación de este [45, 46, 48].

Una forma de mantener este balance es mediante el intercambio gaseoso de CO_3/HCO_3 entre el medio y el exterior. Para esto se debe mantener el aire atmosférico con una concentración de entre 5-10 % de CO_2 [49], lo cual es factible mediante el uso de incubadoras o reactores.

Por lo general, gran parte de los medios comerciales incluyen el rojo fenol como indicador de pH. A bajo pH el indicador se torna de color amarillo, mientras que a altos pH se torna de color púrpura.

Carbohidratos

Los carbohidratos funcionan como principal fuente de energía para el cultivo. Por lo general se utiliza glucosa, debido a que, en células mamíferas, tiene uno de los índices de absorción más altos, aunque también puede utilizarse fructosa, galactosa o maltosa. La cantidad óptima de carbohidratos dependerá de la línea celular utilizada [45, 46, 48].

La concentración de glucosa por lo general se mantiene a 5,5 mM, debido a que esta se asemeja a la concentración normal en la sangre, sin embargo, algunos medios de cultivo pueden contener hasta 25 mM.

Aminoácidos

Los aminoácidos son los componentes que permiten a las células formar proteínas, por lo que su adición al medio de cultivo es crítica. Los aminoácidos esenciales, es decir, los que las células no pueden producir por sí mismas, deben ser incluidos. El aminoácido L-Glutamina es de particular importancia debido a que este es una fuente importante de nitrógeno para la producción de NAD, NADPH y nucleótidos, además de ser una fuente secundaria de energía [45, 46, 48, 50].

Las cantidades de L-glutamina en medios varían por lo general entre 0,68 mM hasta 4 mM.

Sales inorgánicas

Las sales en el medio permiten mantener el balance osmótico, además de ayudar a regular el potencial de membrana por la adición de iones sodio, potasio y calcio al cultivo. El ion calcio es de particular importancia debido a su participación en la adherencia de la célula a la matriz [45, 46].

Vitaminas

Las vitaminas son esenciales para la proliferación de las células, actuando principalmente como coenzimas o grupos prostéticos en los procesos del metabolismo celular. Estas no pueden ser producidas por las células en las cantidades adecuadas durante el cultivo, por lo que es esencial utilizar suplementos [45, 46].

Suero

El suero es un componente proveniente de la sangre luego de la coagulación. Se compone de variados compuestos como glucosa, factores de crecimiento, algunos minerales, entre otros [45, 46, 48]. El suero reconocido por su uso en la clonación celular es el suero fetal bovino. Por lo general los medios de cultivo tienen entre un 2 y 10 % de suero [51].

El suero cumple las siguientes funciones:

- Proveer algunos nutrientes básicos junto a factores de crecimiento y hormonas involucradas con la promoción del crecimiento celular.

- Entrega proteínas de unión como la albumina o transferrina, las cuales se encargan de llevar nutrientes desde el exterior al interior de las células.
- Contiene proteínas que promueven la unión a sustratos, junto con proteínas que permiten que estas se dispersen antes de dividirse.
- Presenta inhibidores que protegen a las células de la proteólisis.
- Contiene minerales como Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Fe^{2+} , etc.

3.4. Eficiencia en la producción de energía de las células

En la vía de producción energética en las células, puede ocurrir o fermentación láctica o bien glicólisis. Si la vía tomada es la menos eficiente, es decir, la fermentación, se obtiene como resultado de la reacción de cada unidad de glucosa, dos unidades de lactato. La glicólisis no tiene producción directa de lactato. Para determinar entonces la vía metabólica preferida por las células se calcula el rendimiento de glucosa/lactato:

$$Y_{l/g} = -q_{lac}/q_{glu} \quad (3.1)$$

Donde:

- q_{lac} : Tasa de producción de lactato
- q_{glu} : Tasa de consumo de glucosa

Si este valor es cercano a 2, el cultivo se considera como poco eficiente, dado que utiliza la vía fermentativa para la producción de energía, mientras que un valor entre 0 y 1,5 se considera mejor en términos del metabolismo celular.

3.5. Métodos de conteo celular para cultivo en microcarriers

Es posible determinar la cantidad de células presentes en un cultivo por vías directas o indirectas [52].

Los métodos directos por lo general requieren, o bien, la lisis de las células, o la separación de estas de los microcarriers. Con ciertos métodos, como por ejemplo, el conteo por tinción de cristal violeta, no es posible determinar la viabilidad celular, mientras que en otros, como por ejemplo, el por azul de tripán, dependen de la eficiencia de la separación de las células de los microcarriers.

Los métodos indirectos incluyen la medición de la actividad metabólica de las células, por ejemplo, el consumo de glucosa o producción de lactato. En estos métodos se puede perder eficacia pasada la fase de crecimiento exponencial [52].

Capítulo 4

Materiales y Método

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 CO₂(Linde)
- Colagenasa tipo I (Gibco, 17018-029)
- Colorante Alzarin Red (ChemCruz, sc205998)
- Colorante Oil Red (ChemCruz, sc203749)
- Cristal violeta (Merk, 42555)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma, D2650)
- EDTA (Merck, 1084180250)
- EGTA (Merk, 324626)
- Etaloamina (Sigma, E0135)
- Glucosa (Sigma, G514)
- Hank's Balanced Salt Solution (Gibco, 14025-092)
- HEPES (Sigma, H3375)
- Suero Fetal Bovino (FBS) (Biowest,S1560)
- Kit medición glucosa (Biosystems,12800)
- Kit medición lactato (Biosystems,12802)
- MEM α modification (Gibco, 11900024)
- Microarrier Cytodex 1 (GE Healthcare, 17044801)
- Microarrier Cytodex 3 (GE Healthcare, 17048501)
- N-Acetyl-L-cisteína (Sigma, A9165)
- Penicilina - Streptomycin (Gibco, 15140-122)
- Putrescina (Sigma, P5780)
- Selenito de Sodio (Sigma, S5261)
- Solución Antibiótico Antimicótico (Sigma, A5955)
- StemPro R Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco™ código A1007001)
- StemPro R Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco™ código A1007101)
- StemPro R Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco™ código A1007201)
- TrypLE (10X) (Gibco, A12177)

4.1.2. Equipos

- Agitador magnético (Barnstead Thermo-lyne, 45600 cellgro™Stirrer)
- Analizador automático en Random Access (Biosystem, Y15)
- Baño térmico (Labtech)
- Cámara de flujo laminar (Nuaire, Nu201330E)
- Centrífuga Boeco C-28
- Centrífuga Eppendorf 5403
- Contador de células automatizado Luna™
- Fluorímetro Fluoroskan Ascent®(Thermo Fisher, 1506450)
- Gabinete de Bioseguridad Clase II Tipo A (Factomet)
- Incubadora (Shel Lab, TC2323)
- Microscopio (Olympus, CK2)
- pHmetro (HANNA)
- Refrigerador -80C (SO-LOW, U8513)
- Tanque N2 líquido (Taylor Wharton XT20)

4.1.3. Material de Laboratorio

- Agua Desionizada
- Agua Destilada
- Botellas 250 y 500 mL
- Cámara Neubauer
- Etanol
- Filtros 0,2 μm (Sigma)
- Filtro celular de 100 μm (Corning, 07-201-432)
- Matraz Erlenmeyer 100 ml y 2 L,
- 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 60 mm
- Propipeta (Drummond)
- Puntas p1000, p200 y p20
- Rotor de reacción (Biosystems, AC11485)
- Spinner Flask 125 ml (Wheaton)
- Spinner Flask 100 ml (Bellco)
- Spinner Flask 25 ml (Wheaton)
- T-flasks 75 y 175
- Tubos eppendorf 2, 1,5 y 0,6 mL
- Tubos falcon 15 y 50 ml

4.2. Método

4.2.1. Preparación del medio de cultivo alpha-MEM suplementado con antioxidantes

Se preparó medio de cultivo α -MEM siguiendo las especificaciones del fabricante. Cada litro de medio se suplementa con:

- 0,1 ml de Etanolamina
- 1 μl de Selenito de Sodio
- 0,001 g de Putrescina
- 0,16 g de N-Acetyl-L-cisteína

4.2.2. Obtención de WJ-MSCs

Obtención de cordones umbilicales humanos

La obtención de los cordones fue gestionada por el colaborador, Dr. David Vantman. Las muestras fueron luego transportadas al CeBiB para su procesamiento.

Obtención de células madre a partir de cordones umbilicales

Los cordones umbilicales fueron transportados en 300 ml de solución salina balanceada de Hank (Hank's balanced salt solution, HBSS) dentro de un frasco de 500 ml. Estos se conservaron en frío a 4°C y fueron procesados antes de las 24 horas de extraídos.

Se limpiaron los cordones con Buffer fosfato salino (PBS) para eliminar los restos de sangre y otros residuos para luego ser cortados en trozos de aproximadamente 5 centímetros de largo, esto de forma perpendicular a los vasos sanguíneos.

A cada trozo se le realizó una incisión de alrededor de 4 milímetros de profundidad, en dirección paralela a los vasos sanguíneos, atravesando toda la longitud de los cordones. Esta incisión permite que el cordón sea abierto, para así extraer los vasos sanguíneos. Los vasos fueron retirados cuidadosamente, con especial interés en no romperlos.

Se retiró el tejido que rodea los vasos, el cual corresponde a la gelatina de Wharton, descartando los vasos sanguíneos. La gelatina fue cortada en trozos de 3 milímetros por lado y estos se depositaron en placas Petri para cultivo de 100 mm por 20 mm. Los trozos se dejaron a temperatura ambiente por unos 5 a 10 minutos para facilitar la adherencia [53]. Pasado el tiempo, se agregó medio de cultivo α -MEM antiox. suplementado con 10 % de FBS y Penicilina Streptomycin.

4.2.3. Obtención de ADSCs

Obtención de tejido adiposo humano

La obtención del tejido adiposo fue gestionada por el colaborador, Dr. Esteban Gonzalez. Las muestras fueron luego transportadas al CeBiB para su procesamiento

Obtención de células madre a partir de tejido adiposo

Se disolvió colagenasa al 0,2 % *P/V* en PBS estéril sin Calcio, Magnesio ni sulfatos. A esta solución se le agregó Antibiótico/Antimicótico 100X para que esta quede al 0,02 % *V/V*..

Se agregó tejido adiposo a la mezcla cuidando de que el volumen de tejido no fuese superior al volumen de la solución de colagenasa. Esta solución se mantuvo en agitación a 37°C por alrededor de 2 a 3 horas a 130 - 140 RPM. Se verificó visualmente que la grasa se encontrara disuelta para proceder a terminar con el proceso de agitado.

Al terminar la agitación, el contenido se distribuyó en diferentes tubos para centrífuga, los cuales se centrifugaron a 1500 RPM por 10 minutos. Terminada la centrifugación, se procedió a eliminar la fase oleosa, el tejido y parte de la fase líquida presente en el tubo, conservando solo el sedimento y alrededor de 3 ml de la fase líquida, procurando así no dañar el sedimento

en esta fase. Luego, se agregó medio de cultivo α -MEM antiox. hasta completar un volumen de 10 ml, para luego volver a centrifugar a 1500 RPM por 10 minutos [54].

Después de la segunda centrifugación se descartó parte de la fase líquida, dejando solo 5 ml de esta junto con el pellet de células, el cual se resuspendió en medio de cultivo suplementado con FBS al 10% y Anti/Anti (10 μ l/ml). Esta suspensión celular se sembró en placas T25 tal como se menciona más adelante.

4.2.4. Conservación de las células: Criopreservación

Para la criopreservación de las células se agregó 1 millón de células en 1 ml de FBS con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada criovial. Para disminuir la temperatura de las células, los crioviales se colocan en Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ y este en un refrigerador hasta alcanzar una temperatura de -80°C. Pasado un día se retiraron los viales de los Mr. Frosty™. Estos fueron almacenados a dos diferentes temperaturas, a -80°C para los que se encontraran próximos en su uso, y a -196°C (en nitrógeno líquido) para los que requerían ser almacenados por más tiempo.

4.2.5. Conteo celular

Para células sin presencia de Microcarriers: Azul de tripán

Se prepara una solución al 0,4% de azul de tripán en PBS, a un pH entre 7,2 y 7,3.

Para el conteo se utilizó el *pellet* resuspendido mencionado en la sección 4.2.6. Se tomó una muestra de 10 μ l la cual fue mezclada con 10 μ l de azul de tripán filtrado. De la muestra se tomaron 10 μ l los cuales se agregan a las placas para el lector LUNA™, o bien a la cámara de Neubauer para un conteo manual.

En la cámara de Neubauer se cuenta por cuadrantes y luego se utiliza la siguiente fórmula para estimar la cantidad de partículas por microlitro:

$$\frac{\text{Partículas}}{\mu\text{l}} = \frac{X}{A[\text{mm}^2] \cdot P[\text{mm}]} \cdot f_d \quad (4.1)$$

Donde:

- A[mm]: Es la superficie contada en milímetros.
- P[mm]: Es la profundidad de la cámara en milímetros.
- f_d : Es el factor de dilución de la muestra.

Utilizando las especificaciones de la cámara utilizada, se llega a la siguiente fórmula:

$$C = \frac{X \cdot 10000 \cdot f_d}{S_q} \quad (4.2)$$

Donde:

- C: La cantidad de células por mililitro presentes en la muestra.
- X: Es la cantidad de células contadas en total.
- S_q : La cantidad de sectores contados en la cámara.

Para células en presencia de Microcarriers: Cristal violeta

Para la solución de conteo se diluye cristal violeta al 0.1 % P/V, en agua destilada. A esta se le agrega tritón al 1 % y ácido cítrico a una concentración 0.1 molar.

Se extrajo una muestra de medio junto a microcarriers dentro de un ambiente estéril cada vez que se realizó un conteo. Las muestras tomadas son de 1 ml, también en ocasiones se tomaron muestras de $10\mu l$ para verificar en microscopio que las células se encuentran adheridas a los microcarriers. De la muestra de 1 ml se descartó parte del medio, por lo general $800\mu l$ y se agregó la misma cantidad de cristal violeta.

Tras agregado el cristal violeta, se agitó la muestra en el vortex por 5 minutos para que las células se lisaran y se pudiera observar los núcleos. Si la muestra generaba espuma, se centrifugaba para reducirla.

De esta solución se toman $13\mu l$ y se ingresan a una cámara de Neubauer para contar en un microscopio los núcleos.

Calibración del método de medición de la densidad celular por fluorescencia

Para esta sección se utilizaron tres tipos de muestras: células diluidas en medio, células junto a microcarriers Cytodex[®]1 diluidos en medio, y células junto a microcarriers Cytodex[®]3 diluidos en medio. En todos los casos se utilizaron ADSCs.

Se prepararon 11 diluciones de células a distintas concentraciones, en este caso desde 0,05 hasta 1 millón de células por mililitro. Se consideró como blanco la medición del medio sin células o bien, del medio con microcarriers, también con una concentración de células nula. Por otra parte la concentración de microcarriers, en los dos casos utilizados, fue de 5 gramos por litro.

En una placa de 96 pocillos se agregan las muestras a distintas concentraciones en triplicado, es decir, se utilizaron 32 pocillos para las 12 concentraciones de medio y células, y otros 32 pocillos para las 12 concentraciones de medio, microcarriers Cytodex[®]1 y células. Se repitió lo mismo para una nueva placa con Cytodex[®]3.

Estos dos ensayos (con Cytodex[®]1 y con Cytodex[®]3) se llevaron a cabo en fechas distintas con subcultivos distintos.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se agregó $90\mu l$ de muestra junto a $10\mu l$ del reactivo Presto Blue[™] HS. La reacción fue llevada a cabo en el fluorímetro Fluoroskan Ascent registrando la fluorescencia durante 1 hora en intervalos de 5 minutos.

Los promedios de los triplicados son los utilizados para la construcción de los resultados.

4.2.6. Cultivo en placas adherentes

En frascos de cultivo de 175 cm^2 se agregaron 25ml de medio $\alpha - MEM_{antiox}$. con 5 % de suero fetal bobino (FBS) se siembran 1 millón de ADSCs. Estas placas luego son incubadas a 37°C en una incubadora con un 5 % de CO_2 . Para las placas de 75cm^2 se utilizaron solo 20 mililitros de medio.

Pruebas de crecimiento

Se realizaron dos experimentos de crecimiento en placas de 6 cm de diámetro con el cual se busca medir las tasas de crecimiento de las ADSCs a modo de comparativa para los estudios subsiguientes en suspensión, los cuales se presentan en la sección 4.2.7.

Primera Prueba

Se sembraron 16 placas de 6 cm de diámetro con 5000 células por cm^2 , para tener una cantidad aproximada de 150000 células por placa. Se utilizaron 5 mililitros de medio de cultivo α -MEM 10 % FBS por placa. Se utilizaron células en su sexto subcultivo.

Se registró una vez cada 24 horas los siguientes datos para dos placas: confluencia, volumen restante de medio en la placa, la cantidad de tripsina y suero utilizada para despegar las células y detener la acción de la tripsina respectivamente, el factor de dilución de las muestras a realizar el conteo celular y la cantidad de células contadas en la cámara de Neubauer.

Segunda Prueba

Se sembraron 20 placas de 6 cm de diámetro, con la misma cantidad de células y medio que en la primera prueba, es decir, 5000 células por cm^2 , para tener una cantidad aproximada de 150000 células por placa. Se utilizaron células en su segundo subcultivo.

Se realizan dos conteos diarios, el primero 16 horas después del último conteo y otro 8 horas después del primer conteo. En cada conteo se registran los siguientes datos para dos placas: confluencia, volumen restante de medio en la placa, la cantidad de tripsina y suero utilizada para despegar las células y parar la acción de la tripsina respectivamente, el factor de dilución de las muestras a realizar el conteo celular y la cantidad de células contadas en la cámara de Neubauer.

Subcultivo de células en adherencia

Cada dos días, tras verificar bajo microscopio que la confluencia de las placas fuera superior al 70 %, se subcultivaron las células presentes en los frascos.

Para esto, se descartó el medio antiguo, y se procedió a quitar los restos de medio con tres lavados con 5 ml de buffer fosfato salino (PBS) por placa.

Se agregó 1,5 ml de tripsina 1X a cada placa para despegar las células incubó por 10 minutos a 37°C . Al finalizar la incubación se detuvo la reacción con 5 ml de medio con FBS al 5 %. El medio con las células fueron centrifugados para obtener un sedimentado de células (*pellet*). Este se resuspendió en 2 ml, se contó la cantidad de células por ml mediante

el método de azul de tripán. Dependiendo del próximo uso, las células fueron sembradas nuevamente a 1 millón de células por placa, tal como se menciona anteriormente, o bien, utilizarse para otros fines, como por ejemplo, inocular el cultivo en suspensión.

Cuando la confluencia era muy baja para subcultivar, se procedió a cambiar el medio de cultivo de las placas. Se descartó el medio presente en los frascos y luego se el volumen de medio asociado a la superficie de la placa.

4.2.7. Cultivo en suspensión

Previo a la realización de estos cultivos fue necesario preparar el material. Los microcarriers se prepararon según las instrucciones del fabricante, hidratandolos en agitación durante 3 horas en 100 ml de PBS por cada gramo de microcarrier. Todos los recipientes utilizados en procesos con microcarriers fueron previamente siliconizados para evitar la adherencia de estos a la superficie. En este caso se utilizó Sigmacote[®]. Finalizado este proceso, se procedió a esterilizar los microcarriers en un autoclave.

En un ambiente estéril se descartó el PBS del recipiente teniendo cuidado de no eliminar microcarriers durante el proceso. Se realizan 3 lavados con medio de cultivo con objeto de evitar la presencia de PBS en la solución. Finalmente se agrega medio de cultivo en el cual se mantendrán definitivamente los microcarriers.

Por otra parte, los Spinner y Matraces a utilizar fueron lavados meticulosamente con detergente y enjuagados con agua y ácido para eliminar las trazas de detergente. Luego estos fueron enjuagados con agua MILLI-Q para luego ser siliconizados con Sigmacote[®], dejando evaporar los restos de silicona.

Con el cultivo iniciado, se tomó una muestra día a día para realizar el conteo de células presentes en el cultivo, por el método de Cristal Violeta.

Cultivos A, B y C: ADSCs en Spinner Flasks

Se inoculó cada spinner flask con medio de cultivo suplementado con 1 % de FBS y 1 % de P/S. A este medio se le añade microcarriers hasta una concentración de 5g/l.

Luego se dejó en un ciclo de agitación para mejorar la adherencia de las células y microcarriers. Al siguiente día se aumentó la concentración de FBS de un 1 % a un 5 %.

Cultivo A: Cultivo en suspensión utilizando microcarriers Cytodex[®]1

Se utilizaron células en su quinto subcultivo y microcarriers Cytodex[®]1 en un total de 25 ml de medio de cultivo, con una densidad inicial de $2 \cdot 10^5$ [cel/ml] en un spinner flask Wheaton de 25 ml. Para la fase de adherencia se realizaron 24 ciclos de 5 minutos de agitación a 80 RPM y 25 minutos sin agitación. Terminada la fase de adherencia, la agitación se mantuvo en 80 RPM. Se tomaron muestra de 1 ml del cultivo cada 24 horas por una semana.

Cultivo B: Cultivo en suspensión utilizando microcarriers Cytodex[®]3

Se utilizaron células en su quinto subcultivo y microcarriers Cytodex[®]3 en un total de

30 ml de medio de cultivo, con una densidad celular inicial de $1 \cdot 10^5$ [cel/ml], utilizando un spinner flask Bellco de 100 ml. Para la fase de adherencia se realizaron 32 ciclos de 5 minutos de agitación a 50 RPM y 25 minutos sin agitación. Terminada la fase de adherencia, la agitación se mantuvo en 50 RPM. Se tomaron muestra de 1 ml del cultivo cada 24 horas por una semana.

Cultivo C: Cultivo en suspensión utilizando microcarriers Cytodex[®]3 y alimentación de glucosa.

Se utilizaron células en su quinto subcultivo y microcarriers Cytodex[®]3 en un total de 60 ml de medio de cultivo, sembrando una cantidad de células correspondiente a $1 \cdot 10^5$ [cel/ml], utilizando un spinner flask Bellco de 100 ml. Para la fase de adherencia se realizaron 32 ciclos de 5 minutos de agitación a 40 RPM y 40 minutos sin agitación. Terminada la fase de adherencia, la agitación se mantuvo en 40 RPM.

Cada día se tomaron muestras del medio de cultivo para ser analizadas en el equipo ANALYZER Y15 de Biosystems, según el protocolo mencionado en la sección 4.2.8. De igual manera, se extrajo un porcentaje del medio diariamente, el cual fue reemplazado con medio fresco y glucosa concentrada a 100 mM, para que así el cultivo alcanzara una concentración de glucosa de 5,5 mM. El día 2 y 3 se renovó el 25 % del medio y desde el día 4 en adelante se recambia el 50 %. Se tomaron muestra de 1 ml del cultivo cada 24 horas por 10 días.

Cultivo D: ADCs en Matraz de Erlenmeyer

Se inoculó matraz de Erlenmeyer de 100 ml con $1 \cdot 10^5$ [cel/ml], además del medio de cultivo compuesto por 5g/l de microcarriers Cytodex[®]3, 1 % de suero fetal bovino(FBS) y 1 % de P/S. La inoculación del matraz se realizó en paralelo con la condición C del cultivo en spinner flasks (4.2.7), por lo que las condiciones son similares.

Se utilizaron células en su quinto subcultivo y microcarriers Cytodex[®]3 en un total de 60 ml de medio de cultivo. Para la fase de adherencia no se realizó agitación alguna por un periodo de 24 horas. Terminada la fase de adherencia, la agitación se mantuvo en 80 RPM, además se aumentó la concentración de FBS a un 5 %.

Se utiliza el mismo régimen de alimentación planteado en la condición C del cultivo en spinner flasks de ADSCs (4.2.7). Se tomaron las muestras del cultivo por seis días.

Cultivo E: WJ-MSCs en Spinner Flask

Se preparó un stock de microcarriers Cytodex[®]1 a una concentración de 20g/l, utilizando 1 gramo de microcarriers en 50 ml de medio de cultivo. Se agregó al spinner flask Wheathon de 125 ml un total de 25 ml del stock de microcarriers, junto a 10 ml del medio de cultivo y 0,5 ml de FBS. Se mantuvo el spinner flask dentro de la incubadora a una temperatura de 37°C y a una concentración de CO_2 del 5 % por 12 horas, con una agitación de 20 RPM.

Pasadas las 12 horas, se inoculó el spinner flask para llegar a un volumen total de 40ml; para esto se utilizó 5 ml de células diluidas a una concentración de $1,25 \cdot 10^6$ [cel/ml], 0,3 ml de FBS y 0,4 ml de P/S. Así, la concentración de FBS inicial fue del 2 %, la densidad inicial de células fue de $1,5 \cdot 10^5$ [cel/ml], la concentración inicial de microcarriers fue de 12,5g/l.

El spinner flask se llevó a la incubadora bajo las condiciones mencionadas anteriormente, donde se mantuvo en un régimen de agitación con el fin de mejorar la adherencia de las células a los microcarriers. Este se compuso de 24 ciclos de 5 minutos de agitación a 30 RPM y luego 25 minutos estáticos.

Diariamente se extrajeron tres muestras de 1 ml. La primera es de una mezcla de microcarriers y medio, esto para realizar un conteo de las células, y dos muestras del medio de cultivo para medir sus niveles de glucosa, según el protocolo mencionado en la sección 4.2.8. La primera muestra se obtiene previo al cambio de medio que se menciona más adelante y la segunda, después de realizado este proceso.

Para realizar el cambio de medio diario, se descartó la mitad del medio de cultivo. Luego, se midió la muestra de glucosa, se calculó la cantidad de glucosa a agregar para mantener el cultivo a 5,5 mM y se agregó el medio de cultivo para completar el volumen inicial. Tras esperar a que se homogenizara el medio, se tomaba la segunda muestra de medio, para ser analizada 24 horas después.

El primer día se aumentó el volumen total del cultivo a 70 ml. Para esto primero se retiró el 50 % del medio de cultivo del spinner flask, y luego se agregó 2,15 ml de glucosa 100 mM para llegar a una concentración en el cultivo de 6,0 mM, 10 ml del stock de microcarriers, cuya concentración era de 20 g/l, para una concentración final de 10g/l, 7 ml de FBS para aumentar la concentración a un 10 %, 0,7 ml de P/S y 30 ml de medio de cultivo fresco.

Los días 2 y 3 se realizó un cambio del 50 % del medio, alimentando con glucosa para llegar a una concentración final de 5,5 mM.

Al cuarto día se volvió a aumentar el volumen del medio de cultivo a 90 ml, para esto primero se retiró el 50 % del medio de cultivo del spinner flask, y luego se agregó 2,1 ml de glucosa 100 mM para llegar a una concentración en el cultivo de 6,0 mM, 10 ml del stock de microcarriers para una concentración final de 10g/l, 5,5 ml de FBS para mantener la concentración a un 10 %, 0,5 ml de P/S y 37 ml de medio $\alpha - MEM$ fresco.

Desde este día se aumentó la alimentación de glucosa para mantener una concentración de 6,0 mM.

Al séptimo día se aumentó nuevamente el volumen a 100 ml. Se retiró el 50 % del medio de cultivo del spinner flask, y luego se agregó 3 ml de glucosa 100 mM para llegar a una concentración en el cultivo de 6,0 mM, 5 ml del stock de microcarriers mantener la concentración en 10g/l, 5,5 ml de FBS para mantener la concentración a un 10 %, 0,5 ml de P/S y 41 ml de medio de cultivo fresco.

Al noveno día se aumentó la concentración de glucosa a 6,5 mM. Se tomaron las muestras del cultivo por diez días.

Cosecha

Para comenzar la obtención de las células adheridas a los microcarriers se descartó la mayor cantidad posible de medio de cultivo del sistema, para luego lavar los microcarriers con PBS. Tras esto se lavaron los microcarriers con una solución de PBS y Ácido etilendia-

minotetraacético (EDTA), utilizando $2\mu\text{l}$ de EDTA al 1 mM por cada ml de PBS.

Terminado lo anterior, se agregó tripsina hasta que la mezcla quedó 1X. Posterior a esto, las células fueron filtradas utilizando un *cell strainer* o filtro celular de $100\ \mu\text{m}$ para ser separadas de los microcarriers y luego contadas por el método del azul de tripán.

4.2.8. Caracterización del Cultivo

Curvas y tasas de crecimiento

Con los datos obtenidos de los conteo celulares se calculó la tasa de crecimiento, ajustando el periodo con mayor producción de células a un crecimiento exponencial. Suponiendo que la velocidad de crecimiento es constante en esta zona se calculó la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) con la siguiente ecuación de crecimiento:

$$X(t) = X_0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot t} \quad (4.3)$$

Donde:

- $X(t)$: Crecimiento celular según el tiempo
- X_0 : Cantidad inicial de células.

Para calcular el tiempo de duplicación se despeja la ecuación anterior cuando $X(t_d) = 2X_0$:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (4.4)$$

Consumo de glucosa

Se tomó una muestra de 1ml de medio de cultivo para ser analizados en el equipo ANALYZER Y15 de Biosystems[®]. Se midió la cantidad de glucosa y de lactato presente en las muestras.

Se ajustó a un polinomio de segundo orden P los valores de glucosa y lactato y se calculó la tasa específica de producción de lactato dividida en la tasa específica de consumo de glucosa ($-q_{lac}/q_{glu}$) promedio para la fase exponencial. Para este cálculo se utilizó la siguiente formula:

$$q_{met} = \frac{\mu}{Cx(t_0)} \cdot \frac{C_{met}(t) - C_{met}(t_0)}{e^{\mu t} - 1} \quad (4.5)$$

Donde:

- $q_{(met)}$: Tasa específica de consumo o producción del metabolito (en este caso glucosa o lactato)
- μ : tasa de crecimiento celular
- $Cx(t_0)$: Cantidad de células en el inicio de la fase exponencial

- $C_{met}(t_0)$: Cantidad de metabolito en el inicio de la fase exponencial
- $C_{met}(t)$: Cantidad de metabolito en el fin de la fase exponencial
- t : Tiempo al final de la fase exponencial.

Para calcular el rendimiento de glucosa/lactato se utiliza la siguiente ecuación:

$$Y_{l/g} = -q_{lac}/q_{glu} \quad (4.6)$$

Donde:

- q_{lac} : Tasa de producción de lactato
- q_{glu} : Tasa de consumo de glucosa

Potencial de diferenciación

Se realizó un ensayo para verificar el potencial de diferenciación de las células madre provenientes de gelatina de Wharton. Este ensayo se realizó utilizando kits de diferenciación comerciales, específicamente, los StemPro[®]Differentiation kits, siguiendo el método propuesto por el fabricante. Se utilizaron placas de 24 pocillos, con tres muestras de control y 3 muestras con medio de diferenciación y cambios de medio cada tres días. El kit utilizado, la densidad de siembra, la duración de la diferenciación y el método de tinción se detalla en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Condiciones para la diferenciación de las células provenientes de gelatina de Wharton.

Diferenciación	Kit	Siembra	Duración	Tinción
Adipogénica	StemPro Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco, A10070-01)	$1 \cdot 10^4 \text{ cel/cm}^2$	14 días	Oil Red
Condrogénica	StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, A10071-01)	$1 \cdot 10^5 \text{ cel/cm}^2$	9 días	Safranina
Osteogénica	StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco, A10072-01)	$1 \cdot 10^4 \text{ cel/cm}^2$	9 días	Alizarin Red

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1. Calibración del método de medición de la densidad celular por fluorescencia

5.1.1. Curva de fluorescencia: Cytodex [®]1

Las figuras 5.1 y 5.2 muestran la fluorescencia emitida por las muestras según su concentración celular, a medida de que avanza el tiempo, para el caso en ausencia y presencia de microcarriers Cytodex[®]1 respectivamente. Es claro que para toda las concentraciones la fluorescencia crece con el tiempo, lo cual es lógico para un reactivo como el Presto Blue[™] HS, el cual al ser reducido por la célula emite fluorescencia, por lo que a medida que avanza el tiempo, más de este compuesto puede ser reducido.

En la figura 5.1 se puede notar que con la concentración de $1 \cdot 10^6[\text{cel}/\text{ml}]$ la reacción no cumple lo esperado y la fluorescencia emitida es menor a la emitida por la muestra a $0,9 \cdot 10^6[\text{cel}/\text{ml}]$. Esto se puede deber a que al añadir el compuesto, este se encontraba en menor cantidad en estas muestras, o bien, la cantidad de células agregadas a la muestra no fue la correcta.

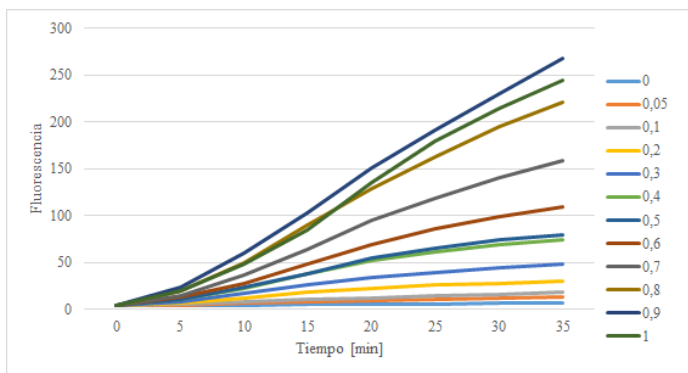


Figura 5.1: Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs a distintas concentraciones según el tiempo. La leyenda muestra las diversas concentraciones de células en $10^6[\text{cel}/\text{ml}]$.

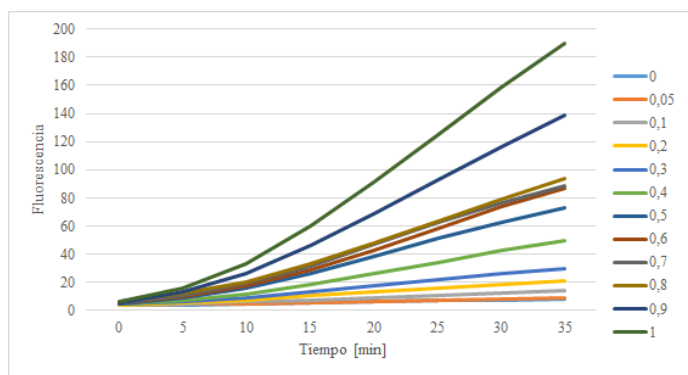


Figura 5.2: Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs a distintas concentraciones según el tiempo en presencia de microcarriers Cytodex[®]1. La leyenda muestra las diversas concentraciones de células en $10^6 [cel/ml]$.

Las figuras 5.3 y 5.4 muestran los cambios en la emisión de fluorescencia de las muestras según la concentración a tiempos fijos para el caso en ausencia y presencia de microcarriers Cytodex[®]1 respectivamente. En estos es visible que, a medida que aumenta la concentración celular, aumenta la fluorescencia emitida. Por otra parte, se pueden notar diferencias entre ambos comportamientos, siendo la diferencia más notoria la forma de las curvas, teniendo en el caso con microcarriers, un estancamiento en la emisión de fluorescencia para las concentraciones de $0,6, 0,7$ y $0,8 \cdot 10^6 [cel/ml]$, muestras que el caso sin microcarriers presenta una disminución en la emisión de fluorescencia para la concentración de $1 \cdot 10^6 [cel/ml]$, tal como se comentó anteriormente. Otra diferencia a notar entre los gráficos es la disminución de la fluorescencia total para el caso con microcarriers, lo cual sugiere que los microcarriers, de alguna manera, apantallan la fluorescencia o bien, interfieren en la captación de Presto Blue[™] HS; sin embargo, no se obtiene evidencia suficiente para determinar la causa, y no se encuentra literatura, por el momento, para poder respaldar lo anterior.

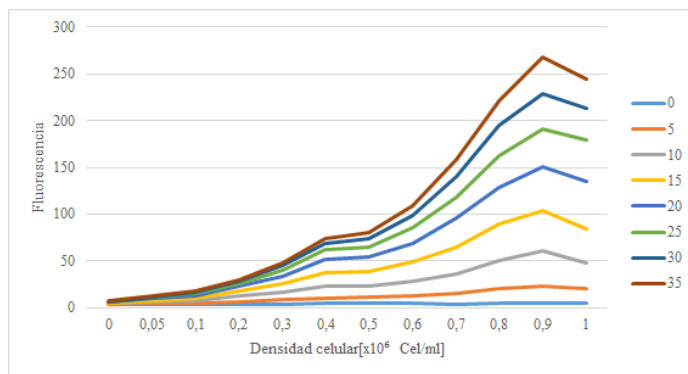


Figura 5.3: Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs en el tiempo según la concentración. La leyenda muestra los diversos tiempos de medición en minutos.

Por último, se determina que el comportamiento de la fluorescencia en el tiempo de las muestras es lineal entre las concentraciones $0,1$ y $0,6 \cdot 10^6 [cel/ml]$ para el caso con Cytodex[®]1, por lo que se cree que el método de conteo celular por fluorescencia pierde exactitud a concentraciones mayores o menores a las mencionadas. Se decide utilizar el mismo rango de concentraciones para el caso sin microcarriers.

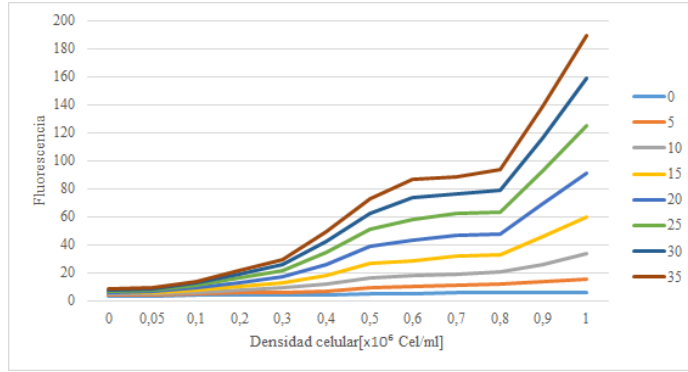


Figura 5.4: Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs en el tiempo según la concentración en presencia de microcarriers Cytodex[®]1. La leyenda muestra los diversos tiempos de medición en minutos.

Así, se obtiene la ecuación de la recta para cada tiempo, junto con su coeficiente de determinación. Se escoge el par de curvas que presenten mejor coeficientes. En este caso se determina que a los 5 minutos es el mejor tiempo para medir, en un rango de concentraciones de $0,1$ y $0,6 \cdot 10^6$ [cel/ml]. Los gráficos en el tiempo y concentraciones mencionadas se presentan en las figuras 5.5 y 5.6 para el caso sin y con microcarriers respectivamente.

Para el caso sin microcarriers, la recta encontrada junto a su R^2 es:

$$y = 1,5051x + 3,8825 \quad (5.1)$$

$$R^2 = 0,9845 \quad (5.2)$$

Mientras que para el caso con Cytodex[®]1:

$$y = 1,0798x + 3,4343 \quad (5.3)$$

$$R^2 = 0,972 \quad (5.4)$$

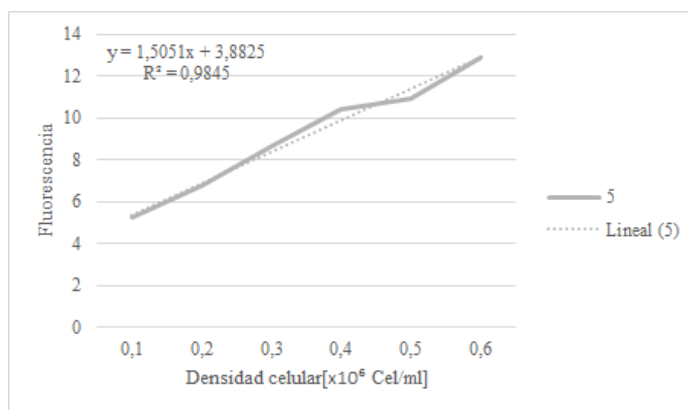


Figura 5.5: Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs a los 5 minutos de comenzada la reacción de Presto Blue™ HS. La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) se muestran en la imagen.

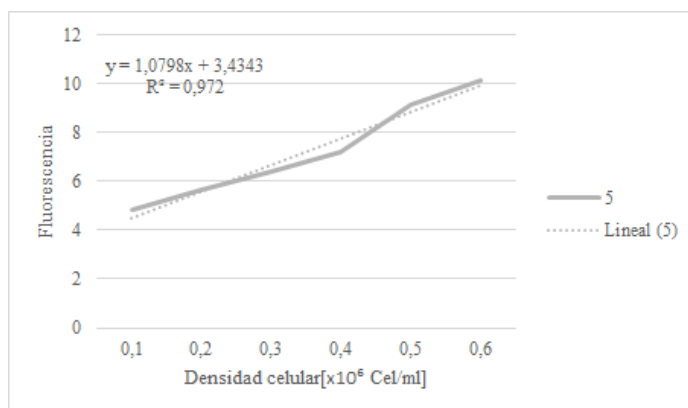


Figura 5.6: Fluorescencia emitida en los ensayos con ADSCs en presencia de microcarriers Cytodex®1 a los 5 minutos de comenzada la reacción de Presto Blue™ HS. La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) se muestran en la imagen.

5.1.2. Curva de fluorescencia: Cytodex 3

Las figuras 5.7 y 5.8 muestran la fluorescencia a medida que avanza el tiempo, y poseen un comportamiento similar al descrito en la sección anterior.

En la figura 5.8 se puede notar que con una concentración de $0,05 \cdot 10^6$ [cel/ml], la reacción después de un tiempo emite una cantidad muy similar de fluorescencia que la muestra sin células. Dado que en un principio parte emitiendo más fluorescencia que la muestra blanco, es posible que a esta concentración, la emisión se vea interferida por los microcarriers, por lo que se encontrará bajo o cerca del límite de detección del fluorímetro, así, el método no es válido para concentraciones celulares tan bajas en presencia de microcarriers.

Por otro lado, en presencia de microcarriers, las emisiones de fluorescencia para las muestras con $0,9$ y $1 \cdot 10^6$ [cel/ml] son mucho más bajas de lo esperado, es decir, son menores a la de la concentración $0,8 \cdot 10^6$ [cel/ml], además las muestras a $0,2$ y $0,3 \cdot 10^6$ [cel/ml] emiten una cantidad de fluorescencia similar. Estos comportamientos se pueden explicar de dos maneras, la manipulación de las células no fue la correcta y las células agregadas fueron menor a la

notada, o bien, para el caso con gran cantidad de células, el método pierde eficacia.

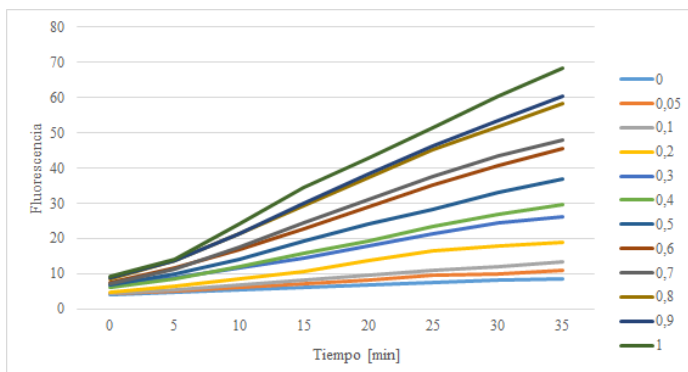


Figura 5.7: Fluorescencia de ADSCs a distintas concentraciones según el tiempo. La leyenda muestra las diversas concentraciones de células en 10^6 [cel/ml].

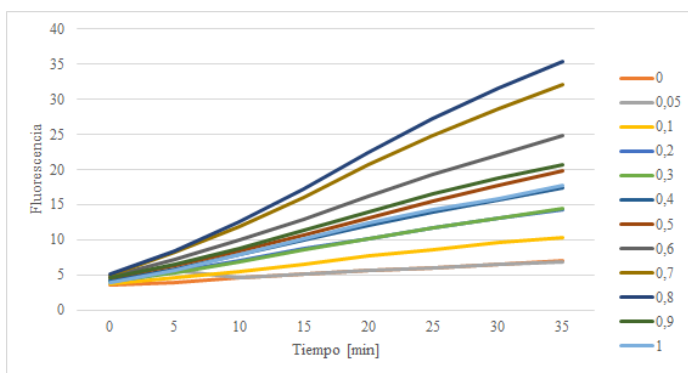


Figura 5.8: Fluorescencia de ADSCs a distintas concentraciones según el tiempo en presencia de microcarriers Cytodex[®]3. La leyenda muestra las diversas concentraciones de células en 10^6 [cel/ml].

Las figuras 5.9 y 5.10 muestran el comportamiento de la fluorescencia emitida por las muestras según la concentración a tiempos fijos para el caso en ausencia y en presencia de microcarriers Cytodex[®]3 respectivamente. En estos se aprecia que a medida que aumenta la concentración celular, aumenta la fluorescencia emitida. Se puede notar diferencias entre los dos gráficos, en el caso con microcarriers se presenta una disminución en la emisión de fluorescencia para la concentración de 0,9 y $1 \cdot 10^6$ [cel/ml], tal como se explicó anteriormente. Otra diferencia a notar entre los gráficos es la disminución de la fluorescencia total para el caso con microcarriers, al igual que lo ocurrido en la sección anterior, y probablemente debido al mismo efecto.

Por último, se determina que el comportamiento de la fluorescencia de las muestras es lineal entre las concentraciones 0,3 y $0,8 \cdot 10^6$ [cel/ml] para el caso con cytodex[®]3, por lo que se cree que el método de conteo celular por fluorescencia pierde exactitud a concentraciones mayores o menores a las mencionadas. Se decide utilizar el mismo rango de concentraciones para el caso sin microcarriers.

Así, utilizando el mismo procedimiento detallado en la sección anterior, se determina que a los 35 minutos es el mejor tiempo para realizar la medición entre las concentraciones 0,3

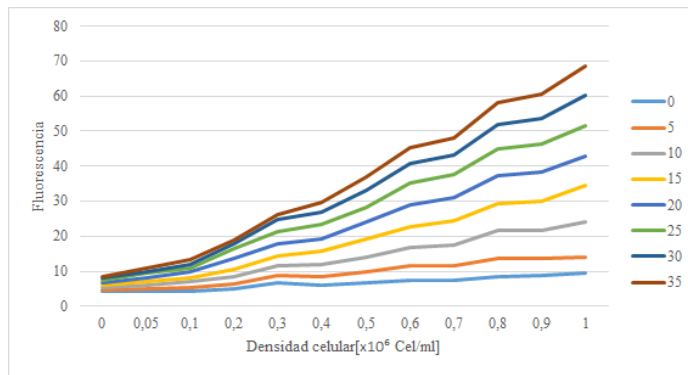


Figura 5.9: Fluorescencia de ADSCs en el tiempo según la concentración. La leyenda muestra los diversos tiempos de medición en minutos.

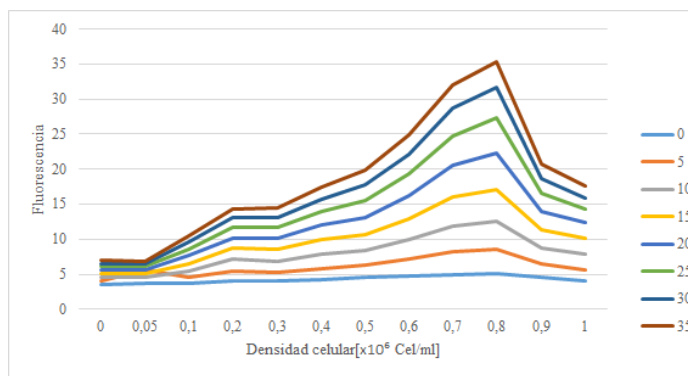


Figura 5.10: Fluorescencia de ADSCs en el tiempo según la concentración en presencia de microcarriers Cytodex[®]3. La leyenda muestra los diversos tiempos de medición en minutos.

y $0,8 \cdot 10^6 [cel/ml]$. Los gráficos para el tiempo mencionado se presentan en las figuras 5.11 y 5.12 para el caso sin y con microcarriers respectivamente.

Para el caso sin microcarriers, la recta encontrada junto a su R^2 es:

$$y = 6,3604x + 18,515 \quad (5.5)$$

$$R^2 = 0,9804 \quad (5.6)$$

Mientras que para el caso con Cytodex[®]3:

$$y = 4,3901x + 8,6124 \quad (5.7)$$

$$R^2 = 0,9704 \quad (5.8)$$

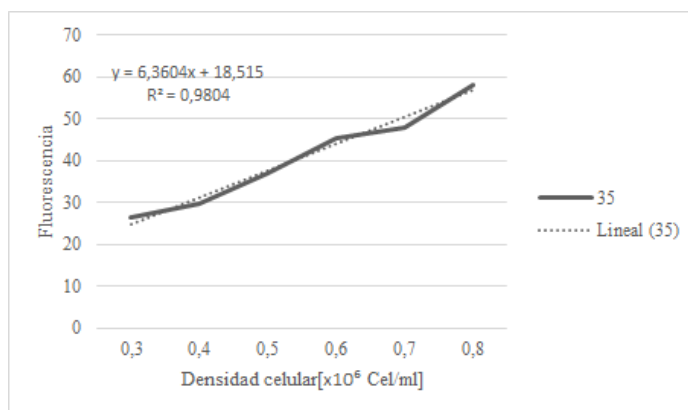


Figura 5.11: Fluorescencia de ADSCs a los 5 minutos de comenzada la reacción de Presto Blue™ HS. La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) se muestran en la imagen.

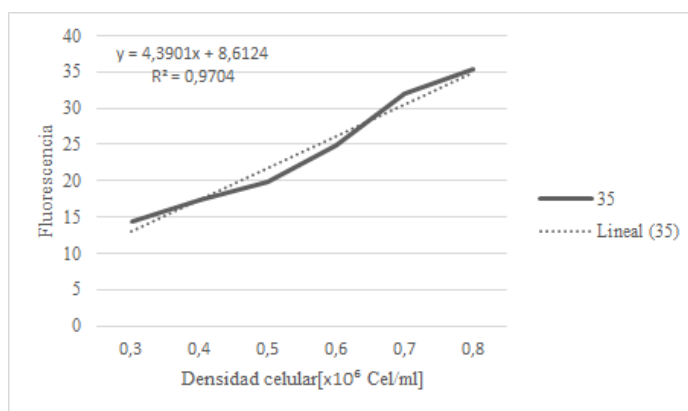


Figura 5.12: Fluorescencia de ADSCs en presencia de microcarriers Cytodex®3 a los 5 minutos de comenzada la reacción de Presto Blue™ HS. La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) se muestran en la imagen.

5.1.3. Sobre el método de conteo por fluorescencia

Finalmente, aunque se determinan puntos para realizar mediciones sobre la densidad celular, se decide no utilizar el método, esto principalmente por la falta de verificación y calibración del mismo, pudiendo entregar resultados poco fiables. El efecto pantalla creado por los microcarriers no pudo ser estudiado debido a que no se realizaron más estudios sobre la medición de fluorescencia en cultivos con presencia de microcarriers.

Cabe también mencionar que entre ambas pruebas, en los casos de células sin presencia microcarriers, las curvas de fluorescencia tienen un comportamiento distinto. En un primer caso se obtuvo emisiones de fluorescencia por sobre 200 puntos (fig. 5.1), mientras que en la siguiente medición la emisión máxima ronda los 70 puntos (fig. 5.7). Esta diferencia se puede deber a que las células utilizadas no se encuentran en el mismo estado metabólico, lo cual puede ser consecuencia de una diferencia en la edad de las células, lo cual es medible en base a los subcultivos por los que han pasado, o bien, a que las células provengan de diferentes donantes. Para poder verificar la reproducibilidad del método, es posible realizar nuevamente

el experimento utilizando células provenientes de solo un donante donante y en un estado metabólico definido, por ejemplo, por el número de veces que han sido subcultivadas.

Una de las principales ventajas el método de medición de densidad celular por fluorescencia es que muestra una alternativa que no implica la separación de las células del microcarrier, y por ende, no depende de la eficiencia de este paso. Una de las desventajas es que el método depende del metabolismo celular, por lo que debería producirse una curva de calibración cada vez que se obtengan células de un nuevo donante, además de estimar la actividad metabólica de las células antes de medir, para que se asemeje a la de las células utilizadas para armar la curva de calibración.

En consecuencia, se propone realizar un estudio a fondo sobre este método y su factibilidad para realizar mediciones de densidad celular.

5.2. Crecimiento celular en placas - ADCs

Dado que las células utilizadas en cada ensayo se encuentran en distintos subcultivos no es posible utilizar los resultados de ambas instancias de medición como un solo grupo, por lo que los resultados se entregan en secciones separadas.

5.2.1. Primera Instancia

En la figura 5.13 se muestra el crecimiento celular a lo largo de las mediciones, expresados en forma de células totales y densidad celular. Dado que tras las primeras 24 horas de cultivo es posible apreciar un crecimiento en la cantidad de células, por lo que se considera como "no visible" la primera fase del crecimiento, es decir, la fase de latencia (o fase lag, por su nombre en inglés). En términos prácticos, para los posteriores cálculos se toma como fase exponencial entre el tiempo 0 y 45,88 [h] debido a que es en este periodo donde se observa el mayor crecimiento de las células. Pasado este tiempo, es posible ver un decaimiento paulatino en la cantidad de células.

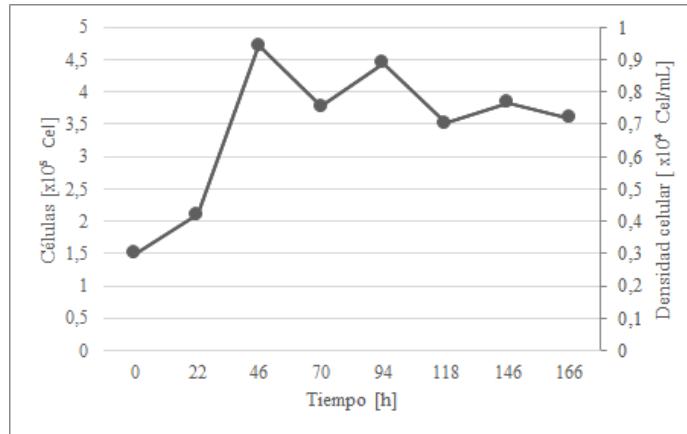


Figura 5.13: Cantidad de células totales y densidad celular en las placas de cultivo según el tiempo para la primera instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.

La tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación encontrados según la fase de crecimiento exponencial descrita son:

$$\mu_{max} = 0,025[h^{-1}] \quad (5.9)$$

$$t_d = 27,76[h] \quad (5.10)$$

En las figuras 5.14 se muestra la cantidad de glucosa y lactato presente en las placas en el tiempo. Se calcula el error como la desviación estándar entre las mediciones de cada muestra y se agrega al gráfico como barras en cada punto. Los resultados obtenidos en esta parte no presentan grandes errores. Se puede notar que la glucosa disminuye con el tiempo, de igual manera que la concentración de lactato va aumentando. Pasada las 46 horas el crecimiento celular se estanca, mientras que la glucosa continua disminuyendo y el lactato aumentando. En esta fase estacionaria las células continúan con su metabolismo, por lo que es normal que se siga consumiendo glucosa, sin embargo, si se encuentran en esta fase por mucho tiempo, la

división celular cesa, provocando la muerte del cultivo [55]. Se debe tener en cuenta que cada día se evaporó 0,1 ml del medio de cultivo, lo que provoca un aumento en las concentraciones.

Mantener una cantidad de glucosa en el medio es de vital importancia, teniendo en cuenta que esto depende del tipo de célula utilizado, no todas tienen el mismo comportamiento. Una concentración muy baja de glucosa, hipoglicemia, afecta en la viabilidad de las células [56], mientras que una alta concentración, hiperglicemia, provoca envejecimiento prematuro de las células madre, reduciendo la proliferación [57]. Por otro lado, respecto al lactato, este es considerado un desecho de los cultivos, y este afecta la proliferación, metabolismo y diferenciación de las células [58]. Esto se puede deber a diversos factores, como la acidificación del medio, la acción química del ion lactato, u otros, como el aumento de la presión osmótica. Ha sido demostrado que el lactato inhibe drásticamente el metabolismo y la proliferación cuando la concentración es mayor a 10 mM [58].

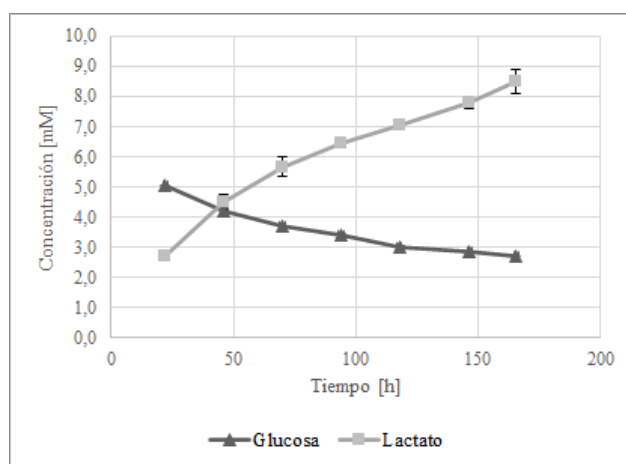


Figura 5.14: Concentración de glucosa y lactato en las placas según el tiempo para la primera instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.

En las figuras 5.15 y 5.16 se muestra el consumo/producción de glucosa/lactato y el rendimiento según los rangos de tiempo en los cuales fueron calculados, cabe decir que un valor negativo muestra el consumo del compuesto, mientras que positivo corresponde a la producción. Es de notar que los primeros días de cultivos es donde se presenta un mayor consumo y producción de glucosa y lactato respectivamente, lo cual, posiblemente, se deba a que en estos períodos las células se deben adherir y adaptar al cultivo.

Los rendimientos lactato/glucosa calculados para cada rango de tiempo se encuentran todos sobre el máximo teórico, es decir, son mayores a 2. Los rendimientos lactato/glucosa más altos se encuentran al comienzo y al final del cultivo, con valores alrededor de 6.

Se calcula el rendimiento de lactato/glucosa promedio para la fase de crecimiento exponencial, el cual en este caso presenta un valor de:

$$Y_{l/g} = 4,07 \quad (5.11)$$

El cual indica que por cada mol consumido de glucosa, se produjeron 4 de lactato. Esto supera el máximo teórico planteado para la fermentación láctica. Se debe tener en cuenta que el medio de cultivo utilizado, $\alpha - MEMantiox.$, presenta piruvato de sodio en su composición,

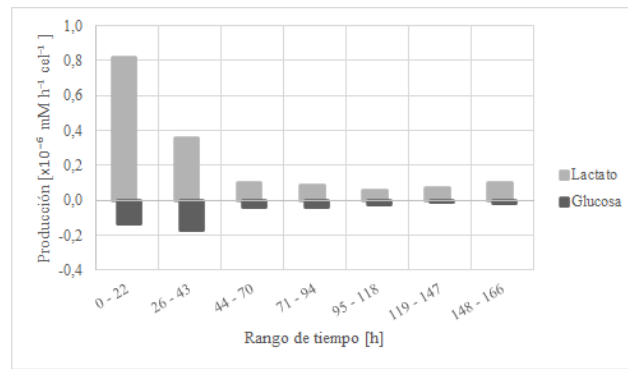


Figura 5.15: Consumo y producción de glucosa y lactato en las placas según los rangos de tiempo para la primera instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.

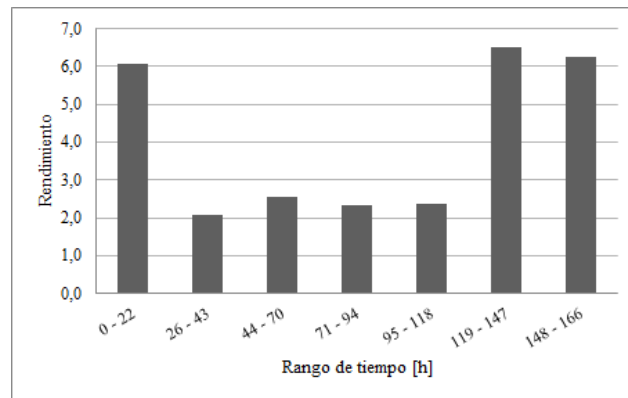


Figura 5.16: Rendimiento de lactato/glucosa en las placas según los rangos tiempo para la primera instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.

el cual es un intermediario en la producción de lactato a partir de glucosa [59], junto a que ciertos aminoácidos, llamados aminoácidos glucogénicos [60], los cuales pueden ser convertidos en glucosa para su utilización en la producción de energía. Estos dos puntos permiten que el rendimiento lactato glucosa se encuentre fuera de los límites. Se considera así el cultivo como ineficiente en términos metabólicos.

5.2.2. Segunda instancia

En las figura 5.17 se muestra el crecimiento celular a lo largo de las mediciones, expresados en forma de células totales y densidad celular. Al igual que en las mediciones anteriores no se distingue la curva típica para el crecimiento de células mamíferas [55]. En este caso las mediciones iniciales se realizaron con menos distancia temporal entre ellas. En esta curva se puede ver que la cantidad de células disminuye en un tercio al comenzar el cultivo. Para los posteriores cálculos se toma como fase exponencial entre el tiempo 26 y 66 [h] debido a que es el periodo donde se observa el mayor crecimiento de las células.

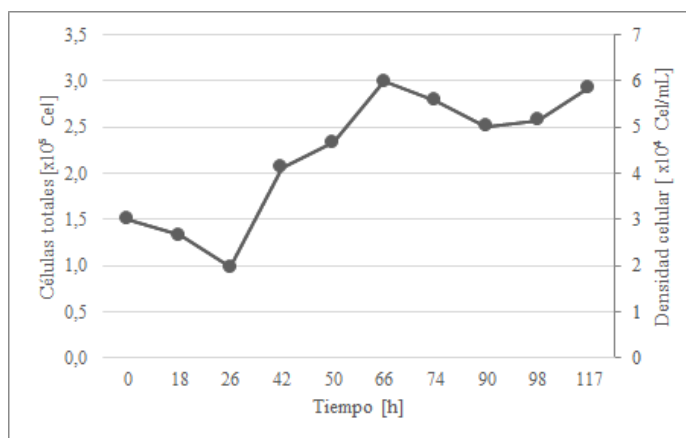


Figura 5.17: Cantidad de células totales y densidad celular en las placas de cultivo según el tiempo para la segunda instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.

La tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación encontrados según la fase de crecimiento exponencial descrita son:

$$\mu_{max} = 0,0279[h^{-1}] \quad (5.12)$$

$$t_d = 24,81[h] \quad (5.13)$$

En esta medición el crecimiento se muestra más rápido que en la medición anterior, sin embargo se encuentra dentro del mismo orden. Estos tiempos de duplicación se muestran mejores a los encontrados en la literatura para las ADSCs, habiendo sido reportados valores de 39,88 horas [61] y de hasta 96 horas [62] en su subcultivo número 25.

En la figura 5.18 se muestran las concentraciones de glucosa y lactato en las placas en el tiempo. Se calcula el error como la desviación estándar entre las mediciones de cada muestra y se agrega al gráfico como barras en cada punto. En este caso se puede notar el comportamiento de los compuestos en las placas; la concentración glucosa disminuye en el tiempo, mientras que la concentración de lactato aumenta.

El comportamiento de estos compuestos presenta ciertas irregularidades, como puntos de disminución en el lactato y de aumento en la glucosa. Esto se debe a que se mide la cantidad de estos metabolitos en distintas placas, por lo que es posible que en alguna la concentración sea más alta o baja que en otras. Por otro lado, en esta medición el error aumenta considerablemente en comparación a la medición anterior, lo cual se puede deber a diversos factores,

por ejemplo, que las células de ciertas placas presentaran un peor rendimiento lactato/glucosa en comparación a las de las otras placas.

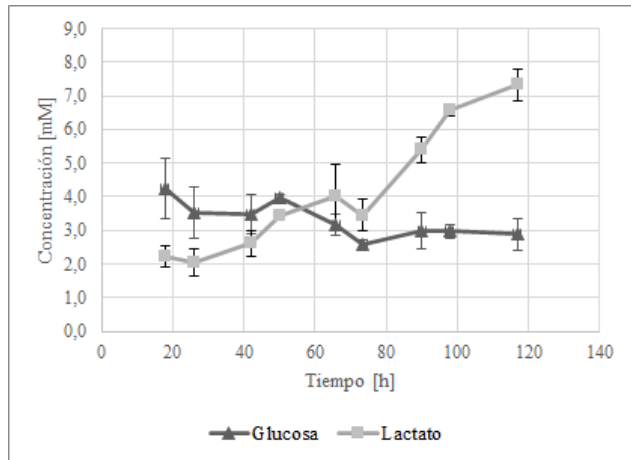


Figura 5.18: Concentración de glucosa y lactato en las placas según el tiempo para la segunda instancia de medición del crecimiento en placas adherentes.

En las figuras 5.19 y 5.20 se muestra el consumo/producción de glucosa/lactato y el rendimiento según los rangos de tiempo en los cuales fueron calculados. Es notorio que en este cultivo se presentan varios casos en que se obtiene una producción de glucosa o bien un consumo de lactato. Esto se explica en el párrafo anterior, cuando se habla de las concentraciones de estos compuestos. Estos errores provocan anomalías en el cálculo del rendimiento lactato/glucosa, obteniendo 4 rangos con valores negativos. Por otra parte, para el rango 91-98 [h] se obtiene un rendimiento de 42, esto se debe al muy bajo consumo de glucosa medido. Se debe tener en cuenta que cada día se evaporó 0,1 ml del medio de cultivo, lo que provoca un aumento en las concentraciones.

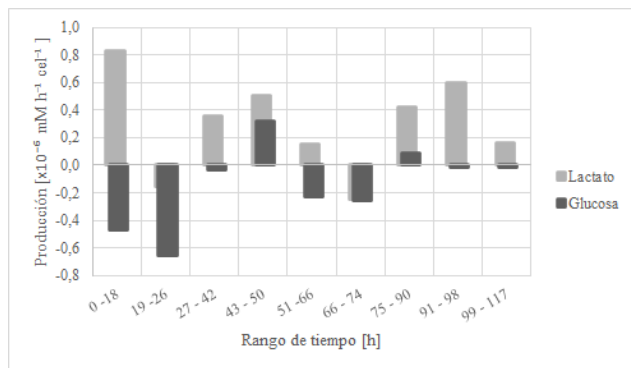


Figura 5.19: Consumo y producción de glucosa y lactato en las placas según los rangos de tiempo para la segunda instancia de medición del crecimiento en placas adherentes. Un valor negativo muestra consumo del compuesto, mientras que positivo producción.

Se calcula el rendimiento de lactato/glucosa promedio para la fase de crecimiento exponencial, el cual en este caso presenta un valor de:

$$Y_{l/g} = 3,03 \quad (5.14)$$

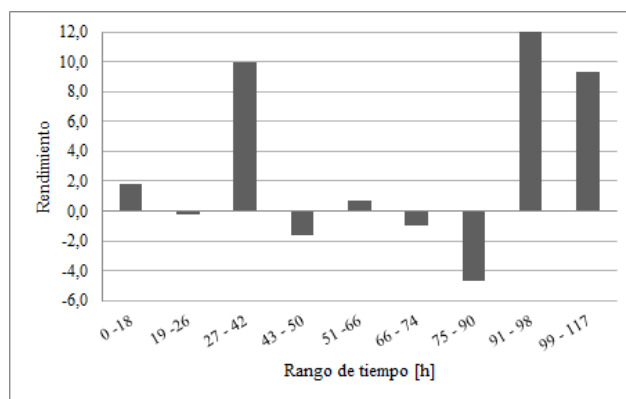


Figura 5.20: Rendimiento de lactato/glucosa en las placas según los rangos de tiempo para la segunda instancia de medición del crecimiento en placas adherentes. El valor del rendimiento para el rango 91-98[h] es de 42.

En este caso, por cada mol consumido de glucosa, se produjeron 3 de lactato. De igual manera que en la instancia anterior se supera el máximo teórico planteado para la fermentación láctica, sin embargo en esta instancia se obtiene un mejor rendimiento, lo cual se puede deber a que se utilizan células más jóvenes (en menor subcultivo), sin embargo, no se obtiene la evidencia suficiente para respaldar esta conjetura. Se considera así el cultivo como ineficiente en términos metabólicos.

5.3. Crecimiento celular en suspensión

5.3.1. Cultivos A, B y C: ADCs en Spinner Flasks

Cultivo A: Cultivo en suspensión utilizando microcarriers Cytodex[®]1

Las figuras 5.21 y 5.22 muestran la cantidad de células presentes por mililitro de cultivo y totales respectivamente. Es claro notar que luego de la siembra el crecimiento de células es mínimo, llegando a un máximo de $0,225 \cdot 10^6 [cel/ml]$, siendo que se inoculó con $0,2 \cdot 10^6 [cel/ml]$. Es posible notar la fase de adaptación celular en el inicio del cultivo, dado que la cantidad de células en 24 horas se mantiene igual a la cantidad de células en la siembra.

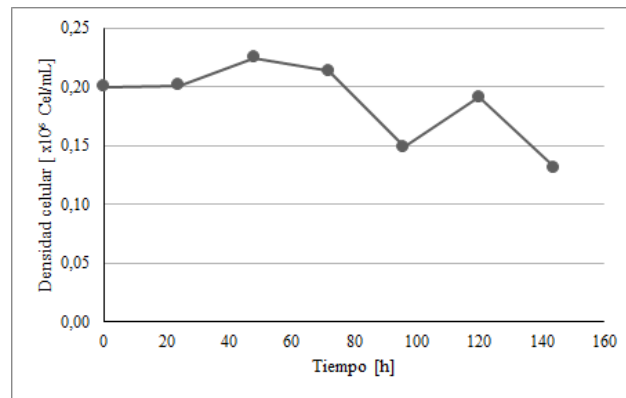


Figura 5.21: Densidad celular en el Cultivo A según el tiempo transcurrido.

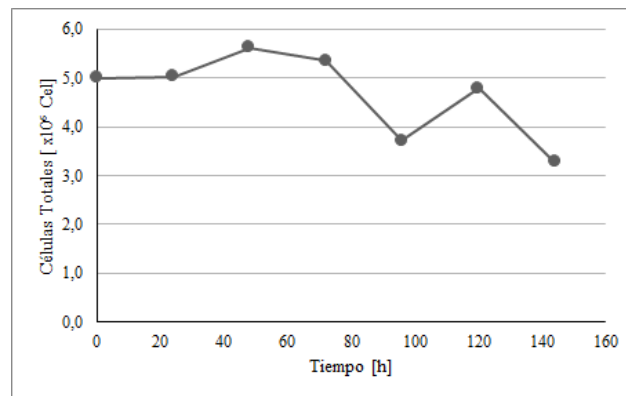


Figura 5.22: Cantidad de células totales Cultivo A según el tiempo transcurrido.

El máximo mencionado anteriormente se obtiene a las 48 horas y luego la cantidad de células comienza a disminuir, por lo que para la fase de crecimiento exponencial se utilizan los puntos entre el tiempo cero, y el recientemente mencionado.

Así, la tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación encontrados para este caso son:

$$\mu_{max} = 0,0025[h^{-1}] \quad (5.15)$$

$$t_d = 282,48[h] \quad (5.16)$$

Es notorio el aumento del orden de magnitud en el tiempo de duplicación, siendo este unas 10 veces mayor al compararlo con los crecimientos en placas (5.2).

El bajo crecimiento del cultivo, junto a su elevado tiempo de duplicación, muestran la poca efectividad de estas condiciones, sin embargo, se puede notar la mayor cantidad de células que el cultivo en suspensión puede manejar en comparación al cultivo en placas. En estos últimos, la máxima densidad de células obtenida fue de $0,01 \cdot 10^6 [cel/ml]$ en el primer crecimiento (fig. 5.13), y de $0,06 \cdot 10^6 [cel/ml]$ en el segundo (fig. 5.17).

Se cree que uno de los principales motivos de porqué este cultivo no obtuvo resultados satisfactorios es el spinner flask utilizado. Este debido a su tamaño y geometría no facilita la suspensión de los microcarriers, por lo que se deben utilizar una velocidad de agitación alta, repercutiendo directamente en el crecimiento celular [42]

Cultivo B: Cultivo en suspensión utilizando microcarriers Cytodex[®]3

Las figuras 5.23 y 5.24 muestran la cantidad de células presentes por mililitro de cultivo y totales respectivamente. En este caso, la densidad de siembra es la mitad que la utilizada en la condición A, es decir, se siembra a $0,1 \cdot 10^6 [cel/ml]$.

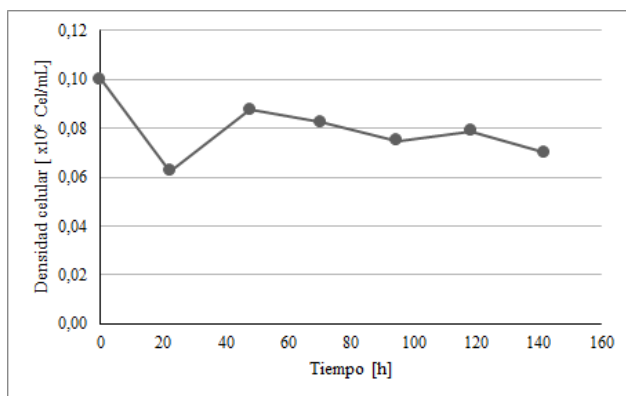


Figura 5.23: Densidad celular en el Cultivo B según el tiempo transcurrido.

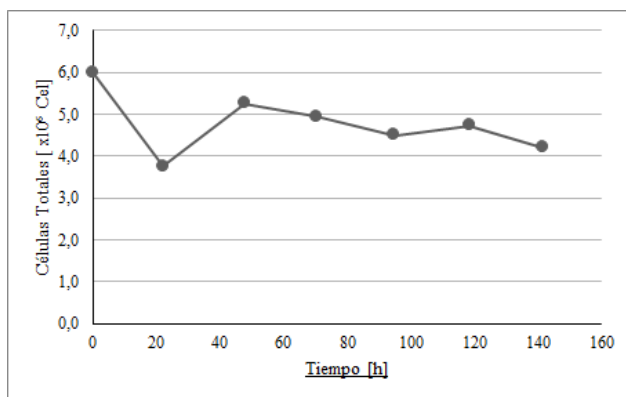


Figura 5.24: Cantidad de células totales en el Cultivo B según el tiempo transcurrido.

En esta caso, es posible observar una disminución en la cantidad de células luego de la inoculación, llegando a disminuir en un tercio a las 24 horas después de la siembra. Esta

disminución se cree que puede estar relacionada a una pobre fase de adherencia, con posible causa la velocidad de agitación. Una alta velocidad de agitación causa estrés a las células, disminuyendo su viabilidad [42].

Dada la disminución en la densidad de células en la fase de adherencia, la densidad máxima bajo estas condiciones, sin contar la inoculación, es de $0,0875 \cdot 10^6 [cel/ml]$, la cual es un 12,5% menor a lo inoculado.

Por lo mencionado anteriormente, los puntos utilizados para los cálculos de crecimiento son los correspondientes a 22 y 46 horas, dado que pasado las mediciones del segundo día la densidad de células se mantiene similar por un día, para luego comenzar a disminuir.

Así, la tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación encontrados para este caso son:

$$\mu_{max} = 0,013[h^{-1}] \quad (5.17)$$

$$t_d = 52,53[h] \quad (5.18)$$

En este caso, el tiempo de duplicación es aproximadamente cinco veces menor que bajo las condiciones A, y unas dos veces mayor que en los cultivos en placas.

Se debe tener en cuenta que la velocidad de agitación óptima debe ser la mínima velocidad que mantenga todos los microcarriers en suspensión [42]. En esta situación, y por lo mostrado en la sección siguiente (5.3.1), la agitación utilizada para este spinner flask puede ser menor. Una alta velocidad de agitación repercute en el crecimiento celular, viabilidad, capacidad de diferenciación, entre otros [42], y se cree que es uno de los motivos por el cual el crecimiento en estas pruebas se ve restringido.

Cultivo C: Cultivo en suspensión utilizando microcarriers Cytodex[®]3 y alimentación de glucosa.

Las figuras 5.25 y 5.26 muestran la cantidad de células presentes por mililitro de cultivo y totales respectivamente para la condición C. En este cultivo la fase de latencia (lag phase en inglés) no alcanza a ser visualizada, dado que tras el primer conteo de células, a las 30 horas, presenta un crecimiento de casi el 70% en comparación a la inoculación. En ambas figuras se ve un decaimiento a la hora 168. Se cree que este decaimiento se debe a mala manipulación y de la muestra en el proceso de conteo.

Las figuras mencionadas anteriormente se puede notar, a diferencia de los cultivos para las condiciones A y B, que la máxima densidad celular cuadruplica la cantidad inoculada. Los principales cambios realizados al cultivo en comparación al cultivo B es la disminución en la agitación y la alimentación de glucosa junto al retiro de lactato. Se cree que la agitación seleccionada para este cultivo juega un rol importante, permitiendo una mejor fase de adherencia de las células a los microcarriers, además de mejorando el crecimiento y viabilidad en comparación al cultivo B [42]. El impacto de la alimentación con glucosa y el recambio de medio se comenta en los párrafos siguientes.

Utilizando los puntos entre el inicio y la hora 196, se calcula la tasa de crecimiento máxima

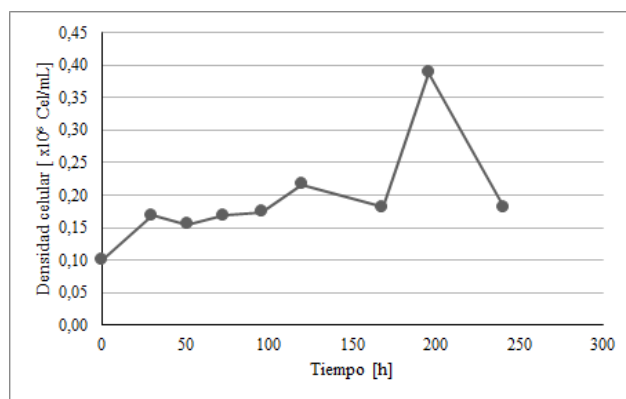


Figura 5.25: Densidad celular en el Cultivo C según el tiempo transcurrido.

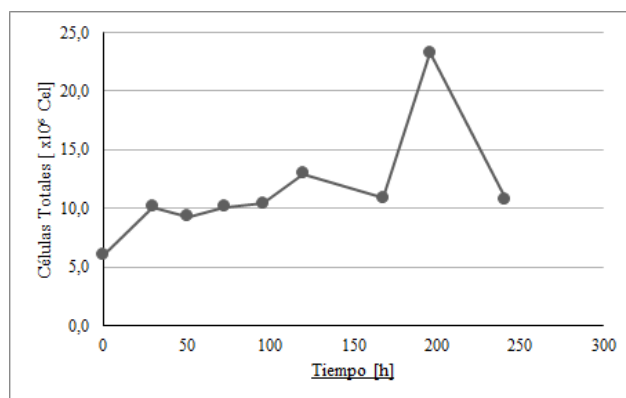


Figura 5.26: Cantidad de células totales en el Cultivo C según el tiempo transcurrido.

y tiempo de duplicación, los cuales para este caso son:

$$\mu_{max} = 0,0069[h^{-1}] \quad (5.19)$$

$$t_d = 100,29[h] \quad (5.20)$$

Aunque la densidad máxima en este caso fue mayor, aún así el tiempo de duplicación es unas 4 veces mayor al de los crecimientos en placas, lo que indica que es lento en comparación a estos mismos.

La figura 5.27 muestra la concentración de glucosa y lactato en el medio de cultivo bajo las condiciones C según avanza el tiempo. En la primera se pueden notar dos puntos de baja concentración de glucosa. El primero, se produce a las 196 horas, y el segundo, entre a las 241 horas. En ambos casos, esto se debe principalmente a que no se realizó cambio del medio de cultivo, y en consecuencia no se agregó glucosa al sistema. Para el lactato, se puede ver como la concentración aumenta drásticamente en estos puntos por el mismo motivo, es decir, el no realizar un cambio de medio. En este caso particular no se alcanza la concentración necesaria para que el lactato comience a interferir de manera considerable, es decir, 10 mM [58]. Por otro lado, es sabido que a concentraciones menores que 1 mM de glucosa la viabilidad de las células disminuye [63]. En este caso, a las 196 horas la glucosa alcanza este mínimo, sin embargo, dado que el tiempo a esta concentración no es prolongado, no es posible notar cambios en la viabilidad.

En comparación con los cultivos anteriores (Cultivos A y B), los cuales son sistemas Batch, este es el primer caso en el que se utiliza una alimentación de glucosa y se descarta parte del medio para disminuir la concentración de lactato, es decir, un sistema semi-continuo. Esto permite que el cultivo pueda sostenerse por más tiempo, prolongando el tiempo ante las eventuales fallas por falta de nutrientes y por altas concentraciones de lactato. Es posible notar que este cultivo se mantuvo por 241 horas, lo cual es cerca 4 días más que en los Cultivos A y B.

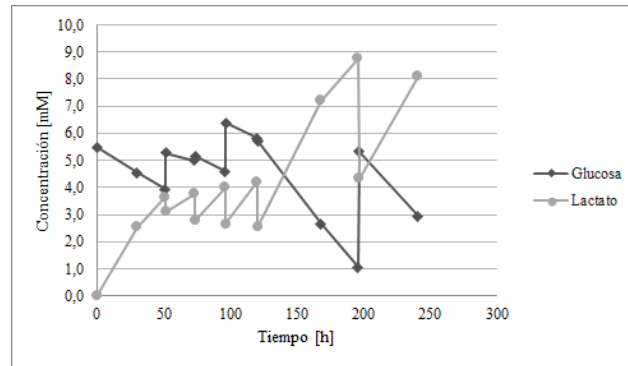


Figura 5.27: Concentración de glucosa y lactato, en mM, presente en el Cultivo C según avanza el tiempo.

En las figuras 5.28 y 5.29 se muestran los consumo/producción de glucosa/lactato y el rendimiento según avanza el tiempo respectivamente. En estas se puede notar como al comienzo del cultivo es cuando las células producen la mayor cantidad de lactato y consumen la mayor cantidad de glucosa, debiéndose esto probablemente a la fase de adaptación que presentan las células al ser inoculadas. En este cultivo, el rendimiento lactato/glucosa se encuentra alrededor de 2,5 para las primeras 120 horas, lo cual se encuentra fuera del rango teórico. En las siguientes horas el rendimiento se encuentra dentro del rango teórico, además alcanzando en el rango 168-198 un rendimiento cercano a 1, siendo este el punto más eficiente en cuanto a metabolismo.

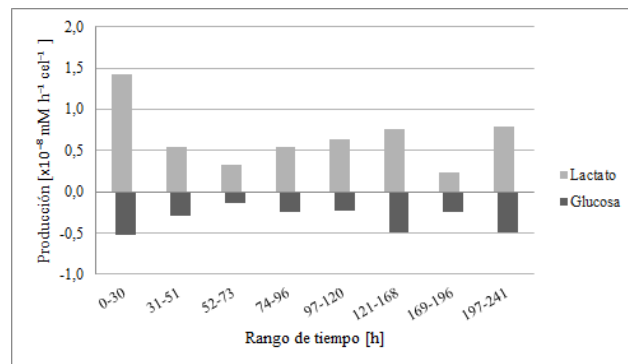


Figura 5.28: Consumo y producción de glucosa y lactato según los rangos de tiempo para el Cultivo C.

El rendimiento promedio para la fase exponencial es:

$$Y_{l/g} = 2,38 \quad (5.21)$$

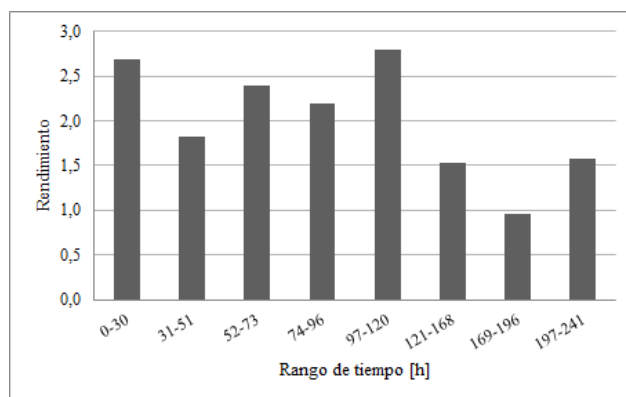


Figura 5.29: Rendimiento de lactato/glucosa en las placas según los rangos tiempo para el cultivo C.

En este caso, la producción de lactato es un poco más que el doble que el consumo de glucosa, lo que indica que la vía metabólica utilizada por la célula para producir energía no es la más eficiente. Es posible notar que aunque el valor se encuentra fuera de la teoría, es menor al encontrado en los cultivos en placas (Sección 5.2), lo que indica una mejora en el metabolismo celular.

5.3.2. Cultivo D: ADCs en Matraz de Erlenmeyer

Las figuras 5.30 y 5.31 muestran la cantidad de células presentes por mililitro de cultivo y totales respectivamente. Al comienzo de este cultivo es posible notar la fase lag, dado que a las 30 horas, es decir, al primer conteo, no se percibe un aumento sustancial en la cantidad de células en el cultivo. Como se ha mencionado anteriormente, esta corresponde a la fase de latencia o *lag phase*. En este caso, al no haber régimen de agitación para mejorar la adherencia [42] y solo se deja reposar las células en los microcarriers por 24 horas, no se aprecia un aumento en la densidad celular como en el Cultivo C.

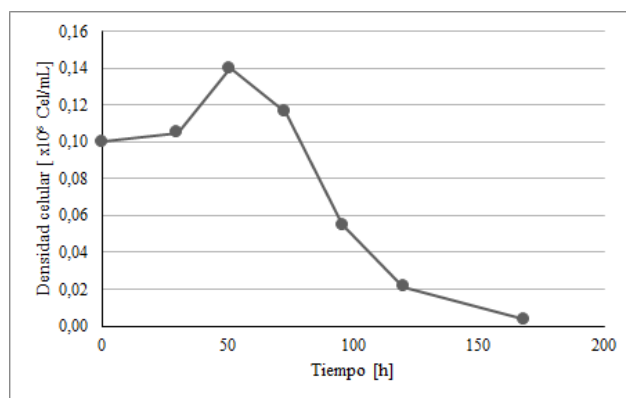


Figura 5.30: Densidad celular en el cultivo en matraz según el tiempo transcurrido.

De estos gráficos es posible notar dos puntos importantes. Lo primero, es que el máximo crecimiento se obtiene alrededor de las 50 horas, con una densidad celular de $0,14 \cdot 10^6 [cel/ml]$. Lo segundo a notar es que luego de este máximo, se presenta una fase de muerte. Esta muerte se presenta de forma apresurada en comparación a los cultivos previos, los cuales presentan

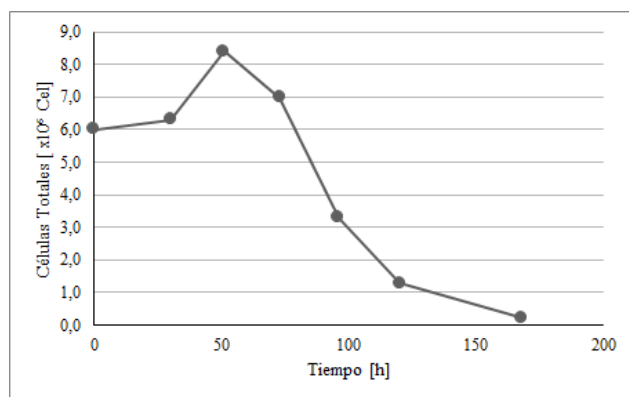


Figura 5.31: Cantidad de células totales en el cultivo en matraz según el tiempo transcurrido.

fases de crecimiento estacionario antes de la disminución de la densidad celular. En este cultivo la muerte total de las células se obtiene al séptimo día.

Debido a que las condiciones en este cultivo son similares a la del Cultivo C, se cree que el principal factor que provocó la muerte de las células es el sistema en la cual se lleva a cabo este, es decir, el Matraz de Erlenmeyer. La geometría de este matraz provoca que sea necesaria una agitación de 80 RPM para mantener los microcarriers en suspensión, lo cual es el doble en comparación al Cultivo C. Debido al resultado obtenido, se descarta la opción de volver a realizar cultivos en suspensión en matraces de Erlenmeyer, sin embargo es posible realizar los estudios para verificar la fuente de la muerte celular.

Se utiliza como fase de crecimiento exponencial los valores entre las 0 y 51 horas. Así, la tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación encontrados para este caso son:

$$\mu_{max} = 0,0066[h^{-1}] \quad (5.22)$$

$$t_d = 105,06[h] \quad (5.23)$$

En este caso se puede observar que el tiempo de duplicación es unas cuatro veces mayor al tiempo de duplicación de los cultivos en placas, lo que quiere decir que el cultivo crece de una forma más lenta en comparación a los cultivos adherentes.

La figura 5.32 muestra la concentración de glucosa y lactato en el cultivo durante su funcionamiento. Es posible notar un comportamiento de *zigzag* en la concentración de lactato y ciertos puntos de aumento en la concentración de glucosa, esto debido a que se recambia parte del medio cada cierto tiempo.

Por otra parte, se puede apreciar como la glucosa disminuye de gran manera, en comparación con otros puntos en el gráfico, los primeros días, lo que coincide con los puntos de mayor crecimiento celular. De la misma manera, la mayor producción de lactato se tiene durante los primeros días.

En esta misma figura, específicamente en la curva de consumo de glucosa, se puede ver que entre las 97 y 120 horas la glucosa aumenta, sin embargo, esto no se debe al cambio de medio como se mencionó anteriormente, más bien es un problema con la medición. Esto se

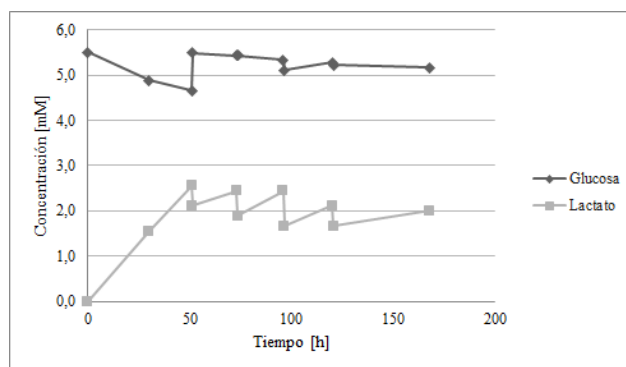


Figura 5.32: Concentración de glucosa y lactato, en mM, presente en el cultivo en matraz acorde al tiempo.

creo que ocurre por la baja cantidad de células presentes en el cultivo, lo que repercute en la baja disminución de la concentración de glucosa. En este caso, la concentración de glucosa, sin contar la baja inicial, se mantiene siempre entre 5,5 mM y 5,1 mM, por lo que cualquier error en la medición puede afectar de una manera visible.

El error mencionado en el párrafo anterior se refleja en el consumo de glucosa (fig. 5.33), y también repercute en el rendimiento lactato/glucosa (fig. 5.34), haciendo que en el rango mencionado este último obtenga un valor negativo para el rango 97-120 horas.

Por otro lado, en la figura 5.34 es posible notar que el rendimiento lactato/glucosa siempre es mayor a 2, excepto en el rango mencionado en el párrafo anterior, lo cual se explica en el siguiente párrafo.

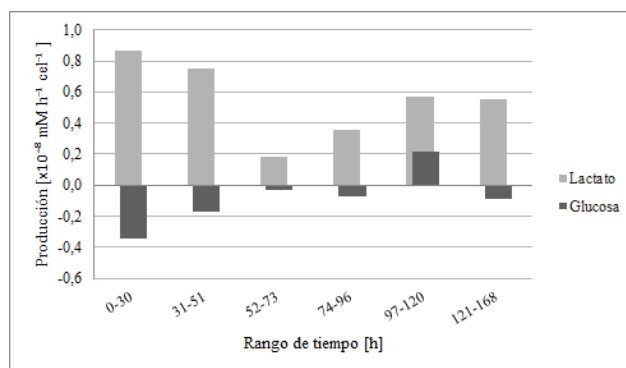


Figura 5.33: Consumo y producción de glucosa y lactato según los rangos de tiempo para el cultivo en matraz.

El rendimiento promedio para la fase exponencial es:

$$Y_{-l/g} = 3,512[] \quad (5.24)$$

Este rendimiento se encuentra fuera del rango teórico. Esto es posible a que el medio de cultivo $\alpha - MEMantiox.$, tal como se mencionó anteriormente, presenta piruvato de sodio y aminoácidos glucogénicos en su composición, los cuales se presentan en las rutas de obtención de energía de las células, y por ende, pueden llegar a producir lactato [59, 60].

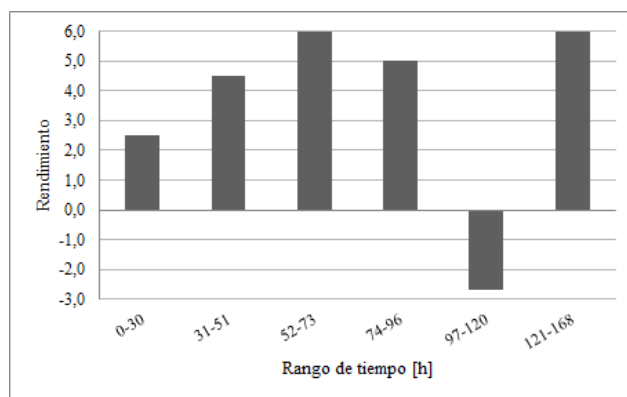


Figura 5.34: Rendimiento de lactato/glucosa según los rangos de tiempo para el cultivo en matraz.

5.3.3. Cultivo E: WJ-MSCs en Spinner Flask

Las figuras 5.35 y 5.36 muestran la cantidad de células presentes por mililitro de cultivo y totales respectivamente. En el inicio del cultivo no es posible apreciar la fase de latencia, dado que a las 24 horas de iniciado, la cantidad de células aumentó 6 veces. Esto se cree posible gracias a una eficaz fase de adherencia, lo que permitió que un porcentaje considerable de las células inoculadas pudieran rápidamente subdividirse. En este caso, el cambio en el spinner flask permite suspender los microcarriers con una agitación de 30 RPM, lo cual disminuye el estrés celular.

Observando la figura 5.35 es notorio que en ciertos puntos (47, 121 y 188 horas) la densidad celular disminuye. Estos puntos corresponden a los conteos celulares el día después de haber aumentado el volumen del cultivo, por lo que es normal que la densidad celular se vea afectada sin afectar al total de células. La figura 5.36 muestra que la cantidad total de células en estos mismos puntos no aumenta considerablemente. Esto se debe a que al aumentar el volumen total, también se agregan nuevos microcarriers para que las células de los microcarriers más confluentes se adhieran. Este proceso requiere el contacto entre microcarriers, por lo que al mantener la agitación, la transferencia de células ocurre lentamente. Si los microcarriers se encuentran demasiado confluentes las células no seguirán duplicándose en ellos, por lo que se deberá esperar a que los nuevos microcarriers se pueblen para continuar con el crecimiento [64]. Este proceso puede ser mejorado con una fase de agitación intermitente, similar a la fase de adherencia utilizada al comienzo del cultivo, para permitir que los microcarriers entren en contacto entre ellos y así mejorar la transferencia [64].

En la figura 5.35 se puede notar que la densidad celular aumenta en unas 15 veces, desde $0,1 \cdot 10^6 [cel/ml]$ hasta $1,49 \cdot 10^6 [cel/ml]$, mientras que la cantidad total se multiplica cerca de 25 veces, desde $6 \cdot 10^6 celulas$ hasta $148,5 \cdot 10^6 celulas$, siendo este el cultivo con mayor producción total de células entre los presentados.

Dado que las tasas de crecimiento se ven afectadas cada vez que agrega volumen, se calcula la tasa de crecimiento máxima y el tiempo de duplicación para distintos periodos de tiempo.

La tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación para el periodo entre el día 0 y

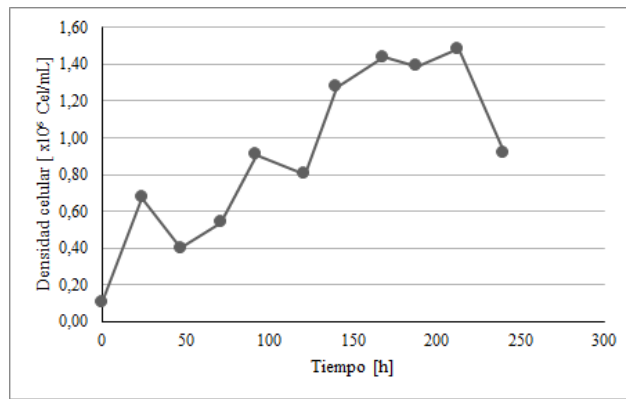


Figura 5.35: Densidad celular en el cultivo de WJ-MSCs según el tiempo transcurrido.

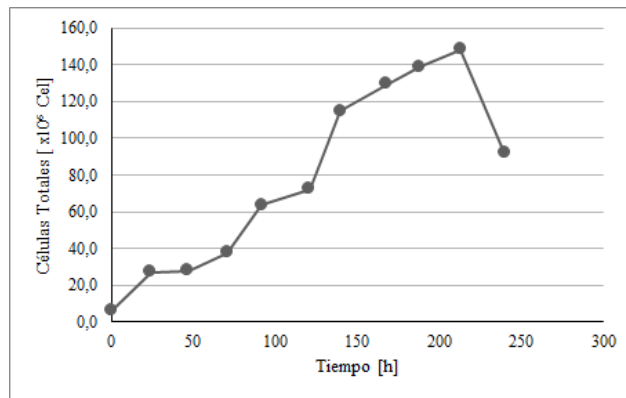


Figura 5.36: Cantidad de células totales en el cultivo de WJ-MSCs según el tiempo transcurrido.

el primer día son:

$$\mu_{max} = 0,063[h^{-1}] \quad (5.25)$$

$$t_d = 11,073[h] \quad (5.26)$$

La tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación para el periodo entre el segundo y cuarto día son:

$$\mu_{max} = 0,018[h^{-1}] \quad (5.27)$$

$$t_d = 37,87[h] \quad (5.28)$$

La tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación para el periodo entre el quinto y sexto día son:

$$\mu_{max} = 0,024[h^{-1}] \quad (5.29)$$

$$t_d = 28,42[h] \quad (5.30)$$

Definiendo como fase de crecimiento exponencial de todo el cultivo desde el tiempo 0 hasta las 140 horas, la tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación son:

$$\mu_{max} = 0,021[h^{-1}] \quad (5.31)$$

$$t_d = 32,86[h] \quad (5.32)$$

Con esto podemos notar que durante las primeras 24 horas, el cultivo tiene una velocidad de duplicación dos veces más rápida que en comparación al cultivo en placas de ADSCs. Dado que de estas 24 horas, 12 corresponden a la fase de adherencia, es posible que esta haya sido rápida y efectiva, lo que permite un crecimiento como el mostrado.

En la totalidad del cultivo, el tiempo de duplicación es solo 1,3 veces mayor en comparación al cultivo en placas de ADSCs. Se ha reportado tiempos de duplicación para WJ-MSCs de entre 20 y 60 horas [65–67], lo que indicaría que el cultivo es eficiente en términos de crecimiento celular, sin embargo, se cree necesario realizar pruebas de crecimiento en placas para las células obtenidas para comparar de forma más exacta. Este resultado muestra que el crecimiento de WJ-MSCs en spinner flask podría ser una mejor opción ante el cultivo en placas.

La figura 5.37 muestra la concentración de glucosa y ácido láctico en el sistema conforme avanza el tiempo tiempo de cultivo. En estas es posible ver el comportamiento de *zigzag* que poseen las concentraciones, lo cual se debe a que cada día se agrega glucosa, y se descarta parte del lactato mediante el cambio de medio.

Dada la creciente cantidad de células, es posible notar la necesidad de aumentar la concentración de glucosa al realizar el cambio medio. La concentración se aumenta de 5,5 mM a 6,5 mM, siendo el día con mayor consumo el noveno, donde la concentración bajó de 6,72 mM a 0,67 mM. Dado que el cambio de medio es parcial, conforme avanza el tiempo, el lactato se acumula, llegando al final del cultivo a una concentración de 18 mM.

Se debe tener en cuenta que en este cultivo, a las 121 horas, se supera la concentración en la cual el lactato comienza a afectar la proliferación, metabolismo y capacidad de diferenciación celular, es decir una concentración de 10 mM [58]. No es posible apreciar un cambio en la proliferación ni el metabolismo a partir de este punto, sin embargo, esto es posible estudiarlo a futuro. Para el caso de la glucosa, es posible notar que en diversos puntos la concentración baja de los 1 mM, es decir, a un punto crítico para la proliferación y viabilidad de las células [63], pero al igual que con el caso del lactato, no es posible apreciar cambios en el cultivo.

Las figuras 5.38 y 5.39 muestran los consumos/producción de glucosa/lactato y el rendimiento de lactato/glucosa respectivamente.

Es posible notar que el consumo de glucosa y producción de lactato por célula en las primeras 24 horas son mayores a los presentados a según avanza el tiempo de cultivo, los cuales mantienen un similar orden de magnitud. Sin embargo, aunque el consumo de glucosa y la producción de lactato en las primeras 24 horas es mayor en comparación a las horas que le siguen, el rendimiento lactato/glucosa en este período es de 1,6, siendo este período uno de los con mejor eficiencia en términos de metabolismo entre todos los rangos calculados.

Entre las 72 y 92 horas se obtiene el peor rendimiento, con un valor de 4,3 moles de lactato por moles de glucosa.

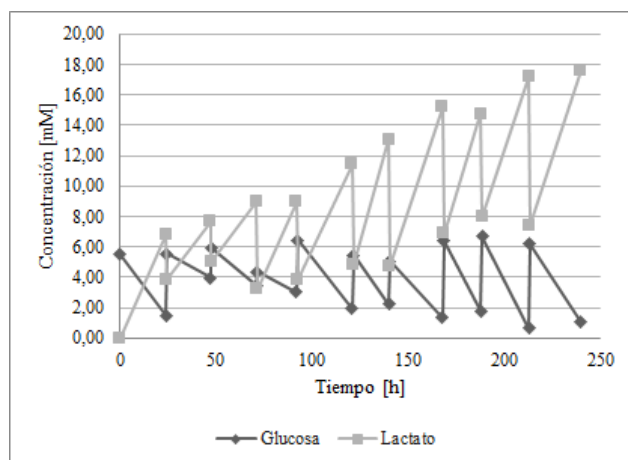


Figura 5.37: Concentración de glucosa y lactato, en mM, presente en el cultivo de WJ-MSCs acorde al tiempo.

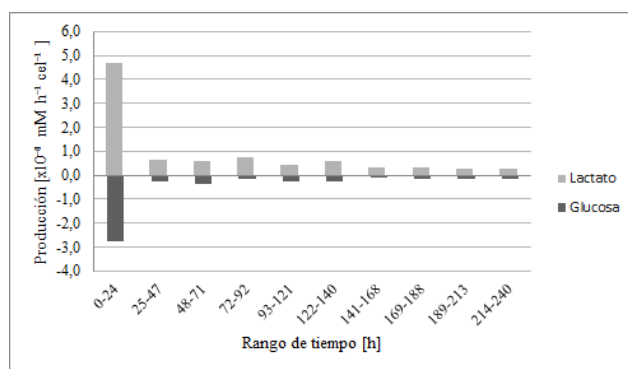


Figura 5.38: Consumo y producción de glucosa y lactato según los rangos de tiempo para el cultivo E.

El rendimiento promedio para la fase exponencial es:

$$Y_{l/g} = 2,39 \quad (5.33)$$

El rendimiento promedio en este caso muestra que el consumo de glucosa en el cultivo pudo haber sido más eficiente. Al igual que en los cultivos previos, el valor obtenido se encuentra fuera de lo posible por la teoría. Como se ha mencionado anteriormente, el medio de cultivo *αMEMantiox*. presenta piruvato de sodio en su composición, junto con ciertos aminoácidos glucogénicos, los cuales pueden ser metabolizados por la célula para la producción de energía, entregando lactato como desecho. Estas nuevas fuentes de energía permiten que la producción de lactato sea más de dos veces el consumo de glucosa [59, 60].

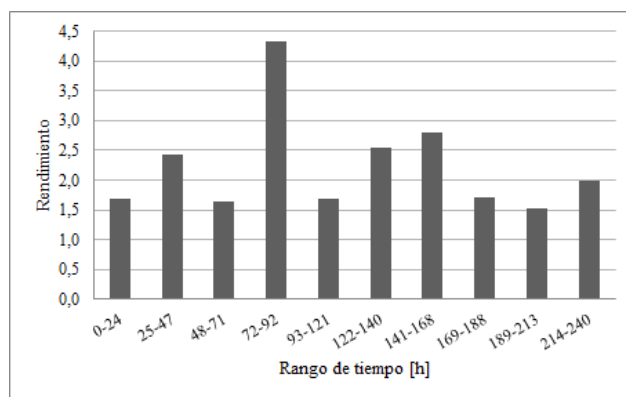


Figura 5.39: Rendimiento de lactato/glucosa según los rangos de tiempo para el cultivo E.

5.3.4. Comparación entre cultivos

Podemos notar que el cultivo bajo las Condiciones B 5.3.1, es decir, el cultivo en suspensión utilizando microcarriers Cytodex[®]3, presenta la peor fase lag, mostrando una baja considerable en la densidad celular. La agitación debe ser lo suficientemente alta para permitir que todos los microcarriers se suspendan en el medio, pero lo suficientemente baja para evitar el daño en las células por choques con las partes del reactor o los microcarriers, o bien por altas fuerzas dentro del fluido [68]. Dado que la condición mencionada anteriormente se cumple para el cultivo C con una menor velocidad de agitación que en el cultivo B, se cree que la alta agitación es la responsable del desempeño de este último. Cabe tener en cuenta que esta comparativa es posible porque se utiliza el mismo spinner flask y paletas de agitación para ambos cultivos.

Del modo contrario, la mejor fase lag y de adherencia la presenta el cultivo en suspensión de WJ-MSCs 5.3.3, aumentando la cantidad de células seis veces al inicio del cultivo. La principal causa de esto se atribuye al cambio de spinner flask. La geometría de este nuevo spinner flask es distinta, presentando un fondo no plano, por lo que con una agitación de solo 30 RPM se suspenden los microcarriers. Esta es la menor agitación utilizada entre todos los cultivos.

Otro factor influyente en lo anterior es la cantidad de células sembradas por microcarriers [69]. Entre los cultivos en suspensión, el con mayor cantidad de células por microcarrier es el cultivo A5.3.1. Este número se puede calcular con la densidad inicial de cultivo y la cantidad de microcarriers utilizados, lo cual en este caso mencionado recientemente sería un aproximado de 13 células. En los cultivos posteriores, es decir, en los cultivos B hasta el E, se siembra a una cantidad de alrededor de 6 células por microcarrier. Dada la falta de evidencia para determinar la influencia de esta cantidad en los cultivos realizados, se propone estudiar el tema para ambos tipos celulares, ADCs y WJ-MSCs.

En términos de tiempo de duplicación, el cultivo con peores resultados es el cultivo A 5.3.1. Entre las condiciones que podrían afectar este resultado se encuentran: la densidad de siembra, velocidad de agitación, geometría del cultivo, volumen total y alimentación.

Siguiendo la idea del párrafo anterior, el cultivo en suspensión con mejores tiempos de

duplicación es el cultivo E 5.3.3. Esto se puede deber a dos grandes factores, la utilización de células de diferente origen y/o paciente (gelatina de Wharton y tejido adiposo), junto al tipo de cultivo y reactor. Como se mostró, la velocidad de duplicación de las ADCs fue de 25 horas, mientras que existen fuentes de velocidades de duplicación similares para WJ-MSCs [65]. Dado lo anterior, se cree que el principal motivo es el cambio de geometría en el cultivo y con ello el régimen de agitación, sin embargo, es una conjetura, dado que no existe comparación para las WJ-MSCs cultivadas en la geometría de los cultivo B y C. Cabe tener en cuenta que el régimen de alimentación, en este caso semi-continuo, no debería tener un efecto directo sobre la velocidad de duplicación, más bien, la alimentación afecta al tiempo total de supervivencia del cultivo, lo que le permite funcionar por más tiempo, alcanzando mayores cantidades finales de células [70].

Observando las figuras relacionadas con el consumo/producción de glucosa/lactato (figs. 5.28, 5.33 y 5.38) es posible notar que en los dos cultivos en placas (5.2.1 y 5.2.2) junto a los tres cultivos en suspensión en los que se midió la concentración de glucosa y lactato, es decir, cultivo C, cultivo D y cultivo E (5.3.1, 5.3.2, 5.3.3 respectivamente), se tiene que en el inicio del cultivo el consumo y la producción de glucosa y lactato son mayores. Esto, como se mencionó en las secciones anteriores, se cree que se debe a que en este punto las células podrían necesitar la energía para adherirse a las placas o microcarriers, sin embargo, no se obtiene evidencia necesaria para respaldar la afirmación. Se propone estudiar a futuro.

Comparando los rendimientos lactato/glucosa de los mismos cultivos mencionados en el párrafo anterior, es posible notar que para ningún caso se obtiene un rendimiento promedio menor o igual a 2, por lo que siempre se encuentran fuera del rango teórico. Existen publicaciones que confirman que las células mesenquimales humanas tienden a utilizar la vía de la glicolisis como medio para obtener energía y no la fosforilación oxidativa, la cual es más eficiente [71], por lo que se cree que esto es lo ocurrido en los cultivos presentados. Aún así, existe un margen de lactato que es producido por el piruvato de sodio presente en el medio de cultivo, junto con aminoácidos llamados glucogénicos, los cuales pueden ser metabolizados a glucosa para la producción de energía [60], lo que provoca el aumento del rendimiento por sobre el límite teórico. Por último, el cultivo con menor tiempo de supervivencia fue el cultivo en matraz (5.3.2). Se utilizó este tipo de recipiente para el cultivo, debido a que es una opción más económica a los spinner flask, teniendo en cuenta que no es tan fácil de escalar como el último mencionado. Así, se presenta como una alternativa para el uso en laboratorio. La muerte del cultivo días antes que su comparativa (Cultivo C, 5.3.1), muestra que esta opción es inviable en las condiciones aplicadas. En los cultivos en suspensión se trabaja con dos tipos de microcarriers distintos, Cytodex[®]1 y Cytodex[®]3. Aunque no se realizan estudios comparativos entre el crecimiento en diversos tipos de microcarriers, cabe mencionar que el área por gramo en seco de los microcarriers Cytodex[®]1 es mayor a la de los Cytodex[®]3. De haber utilizado Cytodex[®]3 en vez de Cytodex[®]1 es posible que dada la mayor área se hayan obtenido cantidades de células mayores a los 140 millones obtenidos, sin embargo se decide no utilizar Cytodex[®]3 debido a otro factor. Los microcarriers Cytodex[®]3, como se mencionó en el marco teórico (Capítulo 3), presentan un recubrimiento de colágeno porcino, mientras que los Cytodex[®]1 no. En este caso, se cree conveniente probar que el crecimiento es posible en microcarriers que no utilicen compuestos animales, dado que las células se utilizarán en terapia celular. Se espera que a futuro se pueda realizar ensayos en medios de cultivo xeno-free.

5.4. Potencial de diferenciación

Las WJ-MSCs obtenidas en el cultivo en suspensión E 5.3.3 son utilizadas para realizar el ensayo de diferenciación, demostrando tener potencial adherente y el potencial para diferenciarse en al menos dos de los tres linajes.

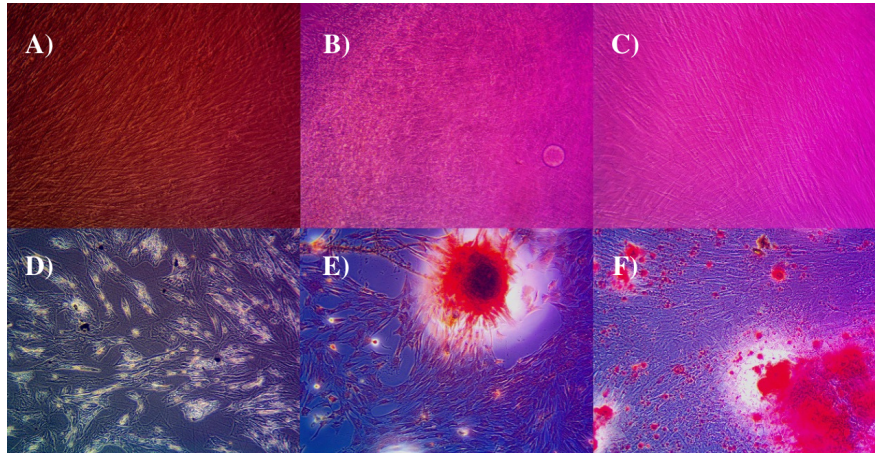


Figura 5.40: Resultados diferenciación de WJ-MSCs, luego de la tinción para el caso control y en medio de diferenciación utilizando Oil Red para la diferenciación adipogénica, safranina para la condrogénica y alizarin red para la osteogénica. En la figura se muestra: A) Células control para ensayo de diferenciación adipogénica, B) Células control para ensayo de diferenciación condrogénica, C) Células control para ensayo de diferenciación osteogénica, D) Células en medio de diferenciación adipogénica, E) Células en medio de diferenciación condrogénica y F) Células en medio de diferenciación osteogénica.

A los 9 días se aplica la tinción con safranina, obteniendo una tinción positiva las células en medio de diferenciación condrogénica (5.40 E)) pero no en los cultivos de control (5.40 B)). La safranina tiñe los glucosaminoglucanos presentes en altas cantidades en las células diferenciadas [72].

De la misma manera, a los 9 días se realiza la tinción con alizarin red para las células del ensayo de diferenciación osteogénica, obteniendo un resultado positivo para las muestras en medio de diferenciación (5.40 F)) y no para las control(5.40 C)). El alizarin red muestra la mineralización y la formación de depósitos de calcio, los cuales se encuentran en mayores cantidades en las células diferenciadas [73].

Para el ultimo caso, la diferenciación adipogénica, se realiza la tinción a los 14 días utilizando Oil Red, el cual reacciona ante ácidos grasos [74]. En este caso se observa que ni las células presentes en el medio de diferenciación (5.40 D)) ni las control (5.40 A)) se tiñen, sin embargo, es posible notar que las células cultivadas en medio de diferenciación si presentan una morfología distinta a las control. Las células control presentan una confluencia mayor y una forma alargada, por lo que forman una especie de tejido, mientras que en las células con medio de diferenciación tienen una confluencia menor y una forma menos definida. Existen varios motivos por el cual la tinción no funcionó, siendo el primero una mala manipulación. La tinción se realizó dos veces con 24 horas de diferencia, dado que la primera vez el tinte utilizado fue preparado con más tiempo de anticipación que el recomendado, por lo que

posiblemente se encontrara fuera de su período de vida útil. La segunda tinción se realizó con las células ya fijadas a la placa 24 horas antes, esta vez con el reactivo en condiciones, sin embargo, es observable que la segunda tinción tampoco fue eficaz. El segundo motivo, y el más obvio, es que las células no se hayan diferenciado en el tipo esperado, lo cual es probable dado que a la vista no es posible encontrar células con características similares a las adiposas, es decir, con adiposomas visibles. Se debe tener en cuenta que las células utilizadas para el estudio de diferenciación son las provenientes del Cultivo E (Sección 5.3.3), las cuales fueron expuestas a concentraciones de lactato mayores a los 10 mM, lo cual puede repercutir en su potencial de diferenciación [58]. De igual manera, se propone realizar nuevamente el estudio de forma previa y posterior al cultivo en suspensión, para así, poder rastrear si la no diferenciación se debe a las condiciones del cultivo, o bien, a las células obtenidas.

La diferenciación en estos tres linajes es necesaria para que estas células puedan ser utilizadas en terapia celular [13], por lo que es altamente necesario volver a realizar este estudio.

5.5. Sobre el estudio de marcadores

Un punto importante que no fue tratado durante el desarrollo del proyecto es el estudio de marcadores. Aunque se obtuvo células con cierto potencial de diferenciación a partir de la gelatina de Wharton, aún falta verificar que estas tengan los marcadores necesarios para poder ser verificadas como WJ-MSCs, es decir, la expresión de CD105, CD73 y CD90 y la ausencia de marcadores para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II. [75].

Conclusiones

La medición de la densidad celular por medio de fluorescencia para cultivos con microcarriers es un método que en la teoría se muestra prometedor, debido a que es un método que permite saber la cantidad de células vivas en una muestra sin necesidad de despegarlas de los microcarriers. Esto en la práctica presenta dificultades debido a la disminución de la fluorescencia emitida por las células al metabolizar el reactivo Presto BlueTM HS en presencia de microcarriers. En este estudio solo se realiza una prueba preliminar sobre el método, por lo que para determinar su eficacia es necesario estudiarlo más a fondo.

Se determinan parámetros de crecimiento de las células madre provenientes de tejido adiposo para su cultivo en el medio α MEMantiox. El tiempo de duplicación en la fase de crecimiento exponencial, en cultivo en placas, para células en su segundo subcultivo es de 24,81 horas, mientras que para células en su sexto subcultivo es de 27,76 horas, ambas en el rango de un día. Los rendimientos glucosa/lactato encontrados para la fase de crecimiento exponencial son respectivamente 4,07 y 3,03, ambos fuera del rango teórico, mostrando que se produce más lactato que el que se debería producir utilizando un metabolismo anabólico para la producción de energía.

Se realizan tres estudios de crecimiento para ADCs en suspensión en spinner flask. Para la fase de crecimiento exponencial se obtiene un rango de tiempo de duplicación de entre 50 y 280 horas. Para el cultivo con mayor índice de crecimiento, en términos de concentración celular, se obtiene un tiempo de duplicación de 100 horas, lo cual es cuatro veces más lento que para el crecimiento en placas. En cuanto para el caso con menor tiempo de duplicación, se obtienen un índice de 52,5 horas, no obstante, gran parte de las células inoculadas murieron durante la fase de adherencia, lo cual provocó que la concentración máxima de células en el cultivo fuese menor a la inoculada.

Se estudia el consumo de glucosa y producción de lactato para un cultivo de ADCs en suspensión en spinner flask. Se obtiene un rendimiento glucosa/lactato de 2,38, el cual indica que la vía utilizada por las células para la producción de energía es la fermentación láctica, sin embargo, este es mayor al máximo teórico para el rendimiento de la fermentación láctica, el cual es de 2.

En la utilización de un Matraz Erlenmeyer a modo de remplazo de los spinner flaks se obtienen resultados desfavorables. La densidad celular en el cultivo comienza a disminuir drásticamente pasadas las 48 horas desde la inoculación, por lo que el remplazo se considera inviable.

Se verifica el protocolo para extraer células madre a partir de explantes de gelatina de Wharton. Las células obtenidas por este método fueron utilizadas para realizar un cultivo en suspensión en microcarriers para luego ser diferenciadas. Se obtiene un tiempo de duplicación para la fase de crecimiento exponencial del cultivo de 32,86 horas, lo cual comparable al cultivo en placas de ADCs, siendo el tiempo del cultivo de WJ-MSCs aproximadamente 1,2 veces mayor. En cuanto a la cantidad de células, esta se multiplica aproximadamente 25 veces en el lapso de 9 días, pasando de 6 millones de células a 148,5 millones de células. El rendimiento glucosa/lactato obtenido es de 2,39, lo cual es cercano al máximo teórico de 2. Esto implica que el metabolismo utilizado para la producción de energía es la fermentación. Se comprueba el potencial de adherencia de las células al realizar el ensayo de diferenciación, el cual requiere la adherencia para poder ser llevado a cabo. En este se obtienen resultados positivos en la tinción para los casos de diferenciación condrogénica y osteogénica. No se obtienen resultados positivos para la tinción en el caso de diferenciación adipogénica, sin embargo, para este ensayo se presentan cambios morfológicos en las células presentes en el medio de diferenciación y no así en las células control. Dado que la tinción solo confirmó la diferenciación a dos linajes, se propone realizar nuevamente este estudio de forma previa y posterior al cultivo en suspensión, para así determinar la fuente del problema. Si las células no pueden diferenciarse a los tres linajes, no podrían ser utilizadas en terapia celular. Se debe tener en cuenta que aún falta verificar que estas células tengan los marcadores necesarios para poder ser verificadas como MSCs, es decir, la expresión de CD105, CD73 y CD90 y la ausencia de marcadores para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II.

Bibliografía

- [1] MedlinePlus. Primary Ovarian Insufficiency. (2020) [en línea] URL: <https://medlineplus.gov/primaryovarianinsufficiency.html> (visitado 20/12/2020).
- [2] Pacheco, J. A. (2010) Falla ovárica precoz. *Anales de la Facultad de Medicina*, **71**, 191 – 200.
- [3] De-Vos, M., Devroey, P., and Fauser., B. (2010) Primary ovarian insufficiency. *The Lancet*, **376**, 911–21.
- [4] NIH Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development. What are the treatments for POI?. (2020) [en línea] URL: <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/poi/conditioninfo/treatments> (visitado 20/12/2020).
- [5] MedicineNet Shiel, W.C Jr. Medical Definition of Cell therapy. (2020) [en línea] URL: https://www.medicinenet.com/cell_therapy/definition.htm (visitado 20/12/2020).
- [6] Gage, F. H. (1998) Cell therapy. *Nature*, **392**, 18–24.
- [7] for Gene, B. S. and Therapy, C. WHAT IS CELL THERAPY?. (2020) [en línea] URL: <https://www.bsgct.org/education/what-is-cell-therapy.aspx> (visitado 20/12/2020).
- [8] Prósper, F., Gavira, J., Herreros, J., Rábago, G., Luquin, R., and Moreno, J. (2006) Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre.. *An Sist Sanit Navar*, **29**, 219–34.
- [9] Nadig, R. R. (2009) Stem cell therapy - Hype or hope? A review.. *Journal of conservative dentistry*, **12**, 131–138.
- [10] Castagnino, J. M. (2005) Células madre embrionarias.. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **39**, 277–278.
- [11] Vijil, H. R. (2015) Regression to the embryonic state: background and current uses of induced pluripotentstem cells. *Revista Facultad de Ciencias Médicas*, **Enero-Junio**, 36–46.
- [12] Caplan, A. I. (2015) Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem*

- [13] Dominici, M., Blanc, K. L., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., and Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.. *Cytotherapy*, **8**, 315–317.
- [14] Jaiswal, R. K., Jaiswal, N., Bruder, S. P., Mbalaviele, G., Marshak, D. R., and Pittenger, M. F. (2000) Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase.. *J Biol Chem.*, **275**, 9645–9652.
- [15] Londoño, C., Büscher, D., Beraza, A., Abad, J. L., and Camarillo, E. (2008) Obtención de células madre immortalizadas derivadas de lipoaspirado para su diferenciación hacia diferentes linajes. *IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health*, Springer Berlin Heidelberg, 667–670.
- [16] Ugarte, D. A. D., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Zhu, M., Drago, J. L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., and Hedrick, M. H. (2003) Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. *Cells Tissues Organs*, **174**, 101–109.
- [17] Silva, K., Liechocki, S., Carneiro, J., da Silva, C. C., maya monteiro, C., and Baptista, L. (2015) Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Research & Therapy*, **6**, 72.
- [18] Alonso-Goulart, V., Ferreira, L. B., Duarte, C. A., de Lima, I. L., Ferreira, E. R., de Oliveira, B. C., Vargas, L. N., de Moraes, D. D., Silva, I. B. B., de Oliveira Faria, R., de Souza, A. G., and de Souza Castro-Filice, L. (2018) Mesenchymal stem cells from human adipose tissue and bone repair: a literature review. *Biotechnology Research and Innovation*, **2**, 74 – 80.
- [19] Wu, Y., Hoogduijn, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S., de Kuiper, R., Yan, L., Wang, L., and van Besouw, N. M. (2017) Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have a Heterogenic Cytokine Secretion Profile. *International journal of stem cells*, **2017**, 1–7.
- [20] CryoCell International. Tejido del cordón umbilical. (2020) [en línea] URL: <https://www.cryo-cell.com/cord-tissue/stem-cells-es#:~:text=El%20TEJIDO%20DE%20CORD%C3%93N%20o,madre%20mesenquimales%20o%20MSCs%20madre>. (visitado 20/12/2020).
- [21] Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., Castaldi, S. G., Serio, B., Bianco, R., Guida, M., and Selleri, C. (2019) Mesenchymal Stem Cells from the Wharton’s Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential.. *International journal of stem cells*, **12**, 218–226.
- [22] Branski, L. K., Gauglitz, G. G., Herndon, D. N., and Jeschke, M. G. (2009) A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns*, **35**, 171–180.

- [23] Kim, S. U. and de Vellis, J. (2009) Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. *Journal Of Neuroscience Research*, **87**, 2183–2200.
- [24] Kassem, D. H. and Kamal, M. M. (2020) Therapeutic efficacy of umbilical cord-derived stem cells for diabetes mellitus: a meta-analysis study. *Stem Cell Res Ther.*, **11**, 484.
- [25] Herraiz, S., Buigues, A., Díaz-García, C., Romeu, M., Martínez, S., Gómez-Seguí, I., Simón, C., Hsueh, A. J., and 8, A. P. (2018) Fertility rescue and ovarian follicle growth promotion by bone marrow stem cell infusion. *Fertility and sterility*, **109**, 908–918.
- [26] Herraiz, S., Romeu, M., Buigues, A., Martínez, S., Díaz-García, C., Gómez-Seguí, I., Martínez, J., Pellicer, N., and Pellicer, A. (2018) Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders. *Fertility and Sterility*, **110**, 496–505.
- [27] Wang, S., Yu, L., Sun, M., Mu, S., Wang, C., Wang, D., and Yao, Y. (2013) The Therapeutic Potential of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Mice Premature Ovarian Failure. *BioMed Research International*, **2013**, 12.
- [28] Rafiq, Q. A., Coopman, K., and Hewitt, C. J. (2013) Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: current technologies and future challenges. *Current Opinion in Chemical Engineering*, **2**, 8–16.
- [29] Thomas, R. J., Chandra, A., Liu, Y., Hourd, P. C., Conway, P. P., and Williams, D. J. (2007) Manufacture of a human mesenchymal stem cell population using an automated cell culture platform. *Cytotechnology*, **55**, 31–39.
- [30] Fernandes, A. M., Marinho, P. A. N., Sartore, R. C., Paulsen, B. S., Mariante, R. M., Castilho, L. R., and Rehen, S. K. (2009) Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **42**, 515 – 522.
- [31] Gupta, S. K., Dangi, A. K., Smita, M., Dwivedi, S., and Shukla, P. (2019) Applied Microbiology and Bioengineering, Pratyooosh Shukla, .
- [32] Shahar, A. (1990) Cultivation of Nerve and Muscle Cells on Microcarriers. *Methods in Neurosciences*, **2**, 195–209.
- [33] Chen, A. K.-L., Chen, X., Choo, A. B. H., Reuveny, S., and Oh, S. K. W. (2011) Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells.. *Stem Cell Res.*, **7**, 97–111.
- [34] Cytiva (2020) CultiSpher gelatine microcarriers. Hyclone media and supplements. *Information Sheet*,.
- [35] Sciences, P. L. (2011) Cell/Tissue Culture and Cell Transfection. Apparatus and consumables - TC-treated membrane inserts. *Information Sheet*, p. 301.
- [36] Scientific, T. (2017) Pall SoloHill® Small-Scale Microcarrier Screening Studies Using

Six-Well Plates and Snap-Top Tubes. *Protocol*, pp. 1–8.

- [37] Derakhtia, S., Safiabadi-Talia, S. H., Amoabedinya, G., and Sheikhpour, M. (2019) Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review. *Materials Science & Engineering C*, **103**.
- [38] Lebera, J., Barekzaia, J., Blumenstocka, M., Pospisila, B., Salziga, D., and Czermak, P. (2017) Microcarrier choice and bead-to-bead transfer for human mesenchymal stem cells in serum-containing and chemically defined media. *Process Biochemistry*, **59**, 255–265.
- [39] Healthcare, G. (2018) Cytodex™ surface microcarriers. *Data file*,.
- [40] Biosciences, A. Microcarrier cell culture principles & methods chapter 2, pp. 30–33 Amersham Pharmacia Biotech Björkgatan 30, SE-751 84 Uppsala, Sweden (1099).
- [41] S, N. Z. Z. A. and Anuar, and N (2011) Comparison of the Production of Recombinant Protein in Suspension Culture of CHO Cells in Spinner Flask and Shake Flask System. *IJUM Engineering Journal*, **12**(4).
- [42] Deorosan, B. and Nauman, E. A. (2011) Expansion of human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) in bioreactors using microcarriers: lessons learnt and what the future holds. *Stem Cells International*, **2011**, 12.
- [43] Gilmore, A. (2005) Anoikis. *Cell Death Differ*, **12**, 1473–1477.
- [44] Yao, T. and Asayama, Y. (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol*, **16**, 99–117.
- [45] Yang, Z. and Xiong, H.-R. (2012) Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells. *Biomedical Tissue Culture*,.
- [46] Arora, M. (2013) Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*, **3**, 175.
- [47] Leon, L. and Gerdtzen, Z. (2019) Cultivo en suspensión de células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo para terapia celular, Universidad de Chile, .
- [48] Scientific, T. F. Technical Support - FAQs. (2021) [en línea] URL: <http://www.oxoid.com/UK/blue/techsupport/its.asp?itsp=faq&faq=tsfaq010&cat=culture+media+%2C+supplements+and+raw+materials&lang=EN&c=UK> (visitado 16/07/2021).
- [49] Howorth, P. J. (1975) The physiological assessment of acid-base balance. *Br J Dis Chest*, **69**, 75–102.
- [50] Lane, C. A., Pax, R. A., and Bennett, J. L. (1987) L-glutamine: an amino acid required for maintenance of the tegumental membrane potential of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **94**, 233–42.
- [51] Hornsby, P. J., Sturek, M., Harris, S. E., and Simonian, M. H. (1983) Serum and growth

factor requirements for proliferation of human adrenocortical cells in culture: comparison with bovine adrenocortical cells. *In Vitro*, **19**, 863–9.

- [52] Blüml, G. (2007) Microcarrier Cell Culture Technology. *Animal Cell Biotechnology, MIBT*, volume **24**, 149–178.
- [53] Petsa, A., Gargani, S., Felesakis, A., Grigoriadis, N., and Grigoriadis, I. (2009) Effectiveness of protocol for the isolation of Wharton’s Jelly stem cells in large-scale applications. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, **45**, 573–576.
- [54] Li, J., Curley, J. L., Floyd, Z. E., Wu, X., Halvorsen, Y. D. C., and Gimble, J. M. Isolation of Human Adipose-Derived Stem Cells from Lipoaspirates pp. 155–165 Springer New York New York, NY (2018).
- [55] Toloudi, M., Ioannou, E., Chatziioannou, M., Apostolou, P., Kiritsis, C., Manta, S., Komiotis, D., and Papatotiriou, I. (2014) Comparison of the Growth Curves of Cancer Cells and Cancer Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, **9**.
- [56] Farrell, M., Shin, J., Smith, L., and Mauck, R. (2015) Functional consequences of glucose and oxygen deprivation on engineered mesenchymal stem cell-based cartilage constructs. *Osteoarthritis and Cartilage*, **23**, 134–142.
- [57] Ferraro, F., Lymperi, S., Méndez-Ferrer, S., Saez, B., Spencer, J. A., Yeap, B. Y., Masselli, E., Graiani, G., Prezioso, L., Rizzini, E. L., Mangoni, M., Rizzoli, V., Sykes, S. M., Lin, C. P., Frenette, P. S., Quaini, F., and Scadden, D. T. (2011) Diabetes Impairs Hematopoietic Stem Cell Mobilization by Altering Niche Function. *Science Translational Medicine*, **3**(104), 104ra101–104ra101.
- [58] Chen, T., Zhou, Y., and Tan, W.-S. (2009) Influence of lactic acid on the proliferation, metabolism, and differentiation of rabbit mesenchymal stem cells. *Cell Biology and Toxicology*, **25**.
- [59] Jones, W. and Bianchi, K. (2015) Aerobic Glycolysis: Beyond Proliferation. *Frontiers in Immunology*, **6**, 227.
- [60] Young, V. R. and Ajami, A. M. (09, 2001) Glutamine: The Emperor or His Clothes?. *The Journal of Nutrition*, **131**, 2449S–2459S.
- [61] Lotfy, A., Salama, M., Zahran, F., Jones, E., and Sobh, A. B. M. (2014) Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *International journal of stem cells*, **7**, 135–142.
- [62] Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X., and Cui, Z. (2008) Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochemistry and Function. Cell Biochemistry and Function*, **26**, 664–675.
- [63] Silva Couto, P., Rotondi, M., Bersenev, A., Hewitt, C., Nienow, A., Verter, F., and Rafiq, Q. (2020) The Role of Glucose, Serum, and Three-Dimensional Cell Culture on the Metabolism of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Biotechnology Advances*,

- [64] Wang, Y. and Ouyang, F. (1999) Bead-to-bead transfer of Vero cells in microcarrier culture.. *Bioprocess Engineering*, **21**, 211–213.
- [65] Nekanti, U., Mohanty, L., Venugopal, P., Balasubramanian, S., Totey, S., and Ta, M. (2010) Optimization and scale-up of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Research*, **5**, 244–254.
- [66] Yoon, J., Roh, E. Y., Shin, S., Jung, N., Song, E., Chang, J. Y., Kim, B., and Jeon, H. (2013) Comparison of Explant-Derived and Enzymatic Digestion-Derived MSCs and the Growth Factors from Wharton’s Jelly.. *BioMed research international*, **2013**, 428726.
- [67] LI, X., BAI, J., JI, X., LI, R., XUAN, Y., and WANG, Y. (2014) Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation.. *International journal of molecular medicine*, **34**, 695–704.
- [68] Sion, C., Loubière, C., Wlodarczyk-Biegun, M., Davoudi, N., Müller-Renno, C., Guedon, E., Chevalot, I., and Olmos, E. (2020) Effects of microcarriers addition and mixing on WJ-MSC culture in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, **157**, 107521.
- [69] Derakhti, S., Safiabadi-Tal, S. H., Amoabediny, G., and Sheikhpour, M. (2019) Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review. *Materials Science and Engineering: C*, **103**, 109782.
- [70] Quinlan, A. V. (1986) A semicontinuous culture model that links cell growth to extracellular nutrient concentration.. *Biotechnology and bioengineering*, **28**, 1455–1461.
- [71] ad Frank W. Janssen, D. S., van Rijn, L. D., Fernandes, H., Bloem, R. M., de Bruijn, J. D., and van Dijkhuizen-Radersma, R. (2009) Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, **15**, 1877–1886.
- [72] Ribatti, D. (2018) The Staining of Mast Cells: A Historical Overview.. *International archives of allergy and immunology*, **176**, 55–60.
- [73] PUCHTLER, H., MELOAN, S. N., and TERRY, M. S. (1969) ON THE HISTORY AND MECHANISM OF ALIZARIN AND ALIZARIN RED S STAINS FOR CALCIUM. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **17**(2), 110–124.
- [74] O’Rourke, E. J., Soukas, A. A., Carr, C. E., and Ruvkun, G. (2009) *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles.. *Cell metabolism*, **10**, 430–435.
- [75] Nery, A. A., Nascimento, I. C., Glaser, T., Bassaneze, V., Krieger, J. E., and Ulrich, H. (2013) Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry A.*, **83**, 48–61.

Anexo

5.6. Anexo A

Componente	Alpha-MEM [mg/l]	DMEM [mg/l]	McCoy's 5 Medium [mg/l]
Aminoácidos			
Glicina	50,0	30,0	7,5
L - Ácido Aspártico			19,97
L- Ácido Glutámico	75,0		22,1
L-Alanina	25,0		13,9
L-Arginina HCl	105,0	84,0	42,1
L - Asparagina			45,0
L - Asparagina H ₂ O	50,0		
L - Cisteína			31,5
L - Cisteína HCl H ₂ O	100,0		
L-Cisteína 2HCl	31,0	63,0	
L - Fenilalanina	32,0	66,0	16,5
L - Glutamina	292,0	584,0	219,2
L - Histidina HCl H ₂ O	31,0	42,0	20,96
L - Isoleucina	52,4	105,0	39,36
L - Leucina	52,0	105,0	39,36
L - Lisina	73,0		
L - Lisina HCl		146,0	36,5
L - Metionina	15,0	30,0	14,9
L - Prolina	40,0		17,3
L - Serina	25,0	42,0	26,3
L - Tirosina			18,1
L - Tirosina 2Na	52,0		
L - Tirosina 2Na 2H ₂ O		104,0	
L - Treonina	48,0	95,0	17,9
L - Triptófano	10,0	16,0	3,1
L - Valina	46,0	94,0	17,6

Componente	Alpha-MEM [mg/l]	DMEM [mg/l]	McCoy's 5 Medium [mg/l]
Vitaminas			
Ácido ascórbico	50,0		0,5
Ácido fólico	1,0	4,0	10,0
Ácido Paraaminobenzoico			
Biotina	0,1		0,2
Clorhidrato de Tiamina	1,0	4,0	0,2
Cloruro de Colina	1,0	4,0	5,0
Niacina			0,5
Niacinamida	1,0	4,0	0,5
Pantotenato de Calcio	1,0	4,0	0,2
Pyridoxal hydrochloride		4,0	0,5
Pyridoxine hydrochloride	1,0		0,5
Riboflavina	0,1	0,4	0,2
Vitamina B12	1,36		2,0
i-Inositol	2,0	7,2	36,0
Sales Inorgánicas			
CaCl2	200,0	200,0	100,0
Fe(NO3)3·9H2O		0,1	
MgSO4	97,67	97,67	
MgSO4·7H2O			200,0
KCl	400,0	400,0	400,0
NaHCO3	2200,0	3700,0	2200,0
NaCl	6800,0	6400,0	6460,0
NaH2PO4·H2O	140,0	125,0	580,0
Otros			
Acido Lipoico	0,2		
D-Glucosa (Dextrosa)	1000,0	4500,0	3000,0
Glutati3n (Reducido)			0,5
Peptona Bacto			600,0
Piruvato de Sodio	110,0		
Rojo de Fenol	10,0	15,0	10,0