



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y
MATERIALES

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y MEJORA EN LA
PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS
DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

TEMISTOCLES ALEXANDER MOLINA BURGOS

PROFESOR GUÍA:
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

PROFESORA CO-GUÍA:
ANAMARÍA DAZA SÁNCHEZ

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
PABLO CAVIEDES FERNÁNDEZ
BÁRBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE
2022

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: TEMISTOCLES ALEXANDER MOLINA BURGOS
FECHA: 2022
PROF. GUÍA: JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y MEJORA EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO

Las células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASC) son células multipotentes de gran interés en medicina regenerativa. Para tener efectos terapéuticos se requieren dosis de cientos de millones de células, sin embargo, esas cantidades no pueden ser aisladas desde tejido graso. Por lo anterior, se han desarrollado distintas estrategias para expandir hASC *in vitro*: cultivos 2-D y 3-D, condición de hipoxia, y enriquecimiento del medio de cultivo.

El objetivo general del presente trabajo es incrementar la cinética de crecimiento de hASC explorando el enriquecimiento del medio de cultivo y las condiciones de normoxia e hipoxia, conservando las propiedades fenotípicas y el potencial de diferenciación de células madre mesenquimales. En particular, el medio de cultivo basal utilizado fue α -MEM antiOX (con antioxidantes) desarrollado en el trabajo de Lorna León, y para el enriquecimiento se utilizó piruvato y nicotinamida. El piruvato actúa como nexo entre la glicólisis y el ciclo tricarboxílico, mientras que la nicotinamida es utilizada como precursor de NAD⁺.

Se montaron cultivos en monocapa con concentraciones de piruvato y nicotinamida entre 1 a 10 mM de acuerdo a un Diseño de Experimentos en hipoxia (5 % O₂) y normoxia (~21 % O₂). Se caracterizó la cinética de crecimiento y el metabolismo de la población celular de cada cultivo, y se utilizó el *fold change* del número de células desde el inicio de la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria para ser ajustado a un Modelo de Superficie de Respuesta y encontrar una combinación óptima de concentraciones de piruvato y nicotinamida dentro del dominio experimental en normoxia e hipoxia.

Se observó que el piruvato y la nicotinamida poseían efectos sobre el crecimiento y metabolismo de hASC tanto en normoxia como en hipoxia. De acuerdo a los Modelos de Superficie de Respuesta, se determinó que las concentraciones óptimas correspondían a 6,29 mM piruvato y 6,37 mM nicotinamida en normoxia, y 3,82 mM de piruvato y 2,8 mM nicotinamida en hipoxia. Al probar el medio α -MEM antiOX enriquecido en piruvato y nicotinamida se obtuvo un mejor desempeño en el crecimiento de hASC y una mayor eficiencia en el aprovechamiento de los nutrientes respecto a la condición basal, reportando un *fold change* de 6,22 en normoxia y 5,2 en hipoxia, y un rendimiento de lactato a partir de glucosa más piruvato de 1,14 en normoxia y 1,32 en hipoxia.

Considerando que la condición normóxica demostró ser más favorable para el crecimiento de hASC, se realizaron pruebas de inmunotipificación de marcadores de superficie y pruebas de diferenciación, mostrando que las hASC cultivadas en medio α -MEM antiOX enriquecido conservan sus propiedades fenotípicas y el potencial de diferenciación. Finalmente, el cultivo fue escalado a suspensión con *microcarriers* Cytodex® 1 donde no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que eventualmente se recomienda repetir el experimento.

OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS AND IMPROVEMENT OF PROLIFERATION OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS

Human adipose-derived stem cells (hASC) are multipotent cells of great interest in regenerative medicine. To have therapeutic effects, doses of hundreds of millions of cells are required, however, these amounts cannot be isolated from fatty tissue. Therefore, different strategies have been developed to expand hASC in vitro: 2-D and 3-D cultures, hypoxic condition, and enrichment of the culture media.

The main objective of this work is to increase the growth kinetics of hASC by exploring the enrichment of the culture medium and the conditions of normoxia and hypoxia, maintaining the phenotypic properties and the differentiation potential of mesenchymal stem cells. In particular, the basal culture media used was α -MEM antiOX (with antioxidants) developed in the work of Lorna León, and pyruvate and nicotinamide were used for enrichment. Pyruvate acts as a link between glycolysis and the tricarboxylic cycle, while nicotinamide is used as a precursor to NAD⁺.

Monolayer cultures were performed with concentrations of pyruvate and nicotinamide between 1 to 10 mM according to a Design of Experiments in hypoxia (5% O₂) and normoxia (~21% O₂). The growth kinetics and metabolism of the cell population of each culture were characterized, and the fold change of cell number from the start of the exponential phase to the start of the stationary phase was used to be adjusted to a Response Surface Model to find an optimal combination of pyruvate and nicotinamide concentrations within the experimental domain in normoxia and hypoxia.

Pyruvate and nicotinamide had effects on hASC growth and metabolism in both normoxia and hypoxia. According to the Response Surface Models, the optimal concentrations in normoxia were 6.29 mM pyruvate and 6.37 mM nicotinamide, and in hypoxia they were 3.82 mM pyruvate and 2.8 mM nicotinamide. When testing the enriched α -MEM antiOX media with pyruvate and nicotinamide, a better performance was obtained in the growth of hASC and greater efficiency in the use of nutrients compared to the basal condition, reporting a fold change of 6.22 in normoxia and 5.2 in hypoxia, and a lactate yield from glucose plus pyruvate of 1.14 in normoxia and 1.32 in hypoxia.

Considering that the normoxic condition was the most favorable for the growth of hASC, immunophenotyping tests of surface markers and differentiation tests were performed. hASC kept in enriched α -MEM antiOX media maintaining their phenotypic properties and differentiation potential. Finally, the culture was scaled to suspension with Cytodex® 1 microcarriers. Satisfactory results were not obtained, so it is recommended to repeat the experiment eventually.

*Gracias a mi hermana, mi mamá y mi papá,
por siempre apoyarme y preocuparse de mí.*

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
2. Objetivos y limitaciones	3
2.1. Objetivos	3
2.2. Limitaciones	3
3. Marco teórico	5
3.1. Metabolismo de células madre	5
3.1.1. Estado quiescente, proliferativo y diferenciado	7
3.2. Medios de cultivo para células madre	8
3.2.1. Suero, reemplazo de suero animal, y medios libres de suero	9
3.2.2. Antioxidantes	9
3.3. Estrategias de bio-procesos para cultivos de células madre	10
3.3.1. Cultivos 2-D y 3-D	10
3.3.1.1. Cultivos en suspensión con <i>microcarriers</i> y esferoides	11
3.3.2. Condición de hipoxia	14
3.3.3. Enriquecimiento del medio de cultivo	15
3.3.3.1. Piruvato	15
3.3.3.2. Nicotinamida	17
3.4. Metodología de superficie de respuesta	18
3.4.1. Modelo de primer y segundo orden	18
3.5. Regímenes de operación de cultivo	19
4. Materiales y métodos	21
4.1. Reactivos	21
4.2. Equipos	22
4.3. Material de laboratorio	22
4.4. Métodos	23
4.4.1. Preparación de medio de cultivo basal	23
4.4.2. Banco de células	23
4.4.3. Expansión de células para experimentos en monocapa y suspensión	24
4.4.4. Cultivo en monocapa	24
4.4.4.1. Recuento de células	24
4.4.5. Cultivo en suspensión	24
4.4.5.1. Preparación de <i>microcarriers</i>	24
4.4.5.2. Siembra y cultivo	25
4.4.5.3. Recuento de células	25
4.4.6. Análisis de crecimiento celular	25

4.4.6.1.	<i>Fold change</i> del número de células	25
4.4.6.2.	Tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación	26
4.4.7.	Análisis metabólico	26
4.4.7.1.	Evaluación de concentración y moles de metabolitos	26
4.4.7.2.	Tasas específicas de consumo y producción de metabolitos	26
4.4.7.3.	Rendimientos de lactato a partir de fuentes de carbono	27
4.4.8.	Metodología de superficie de respuesta	27
4.4.8.1.	Diseño de experimentos	27
4.4.8.2.	Modelo de superficie de respuesta	28
4.4.9.	Caracterización de propiedades troncales	28
4.4.9.1.	Inmunotipificación de marcadores de superficie	28
4.4.9.2.	Potencial de diferenciación	29
5.	Resultados y discusión	30
5.1.	Cultivo en monocapa	30
5.1.1.	Concentraciones óptimas de nicotinamida y piruvato	38
5.1.2.	Respecto a la metodología de optimización	43
5.2.	Propiedades de células madre	44
5.3.	Cultivo en suspensión	47
5.3.1.	Respecto al escalamiento del cultivo	51
5.4.	Proyecciones	51
6.	Conclusiones	53
	Bibliografía	55
	Anexos	69
	A. Composición medio α-MEM	70
	B. Datos citometría de flujo	72

Índice de Tablas

3.1.	Características de <i>microcarriers</i> comerciales	12
3.2.	Tabla comparativa cultivo en monocapa y en suspensión con <i>microcarriers</i> . .	13
3.3.	Concentraciones de piruvato y nicotinamida estudiadas en cultivos de células madre (sin efectos citotóxicos declarados/observados)	18
4.1.	Componentes para 1 L de medio α -MEM antiOX	23
4.2.	Especificaciones <i>microcarriers</i> Cytodex® 1	25
4.3.	Diseño de experimentos	28
4.4.	Especificaciones para ensayos de diferenciación	29
5.1.	Parámetros de crecimiento celular de hASC	30
5.2.	Parámetros de metabolismo celular de hASC	36
5.3.	Parámetros del crecimiento y metabolismo de hASC en normoxia utilizando medio α -MEM antiOX enriquecido	40
5.4.	Parámetros del crecimiento y metabolismo de hASC en hipoxia utilizando medio α -MEM antiOX enriquecido	41
5.5.	Inmunotipificación de marcadores de superficie	44
5.6.	Parámetros del crecimiento y metabolismo de hASC en suspensión bajo normoxia	47
A.1.	Componentes medio de cultivo α -MEM (Gibco™)	70
A.2.	Componentes medio de cultivo α -MEM (Gibco™) (continuación)	71

Índice de Ilustraciones

3.1.	Metabolismo de células madre	6
3.2.	Células madre quiescentes, proliferativas y diferenciadas	7
3.3.	Representación de técnicas de cultivo de células madre	11
3.4.	Cultivo de hMSC en base a <i>microcarriers</i> y esferoides	13
3.5.	Metabolismo de MSC en hipoxia	14
3.6.	Destinos del piruvato	16
3.7.	Regeneración de NAD ⁺ a partir de la producción de lactato y nicotinamida	17
3.8.	Modos de operación de cultivos de células madre	20
4.1.	Representación gráfica del diseño de experimentos.	28
5.1.	Experimentos 1 (1 mM Pyr y 5,5 mM Nam), 2 (10 mM Pyr y 5,5 mM Nam) y 3 (5,5 mM Pyr y 1 mM Nam)	32
5.2.	Experimentos 4 (5,5 mM Pyr y 10 mM Nam), 5 (5,5 mM Pyr y 5,5 mM Nam) y 6 (2,31 mM Pyr y 8,69 mM Nam)	33
5.3.	Experimentos 7 (8,69 mM Pyr y 8,69 mM Nam), 8 (8,69 mM Pyr y 2,31 mM Nam) y 9 (2,31 mM Pyr y 2,31 mM Nam)	34
5.4.	Consumo específico de glucosa a distintas concentraciones de piruvato. Se comparan los experimentos 1 y 2 (barras azules), 9 y 8 (barras amarillas), 6 y 7 (barras verdes).	36
5.5.	Producción específica de lactato a distintas concentraciones de nicotinamida. Se comparan los experimentos 3 y 4 (barras azules), 9 y 6 (barras amarillas), 8 y 7 (barras verdes).	37
5.6.	Producción específica de lactato a distintas concentraciones de piruvato. Se comparan los experimentos 1 y 2 (barras azules), 9 y 8 (barras amarillas), 6 y 7 (barras verdes).	38
5.7.	Gráfico de contornos para la respuesta <i>fold change</i> en función de la concentración de piruvato y nicotinamida.	39
5.8.	Cultivo en α -MEM antiOX y en α -MEM antiOX enriquecido bajo normoxia	40
5.9.	Cultivo en α -MEM antiOX y en α -MEM antiOX enriquecido bajo hipoxia	42
5.10.	Diferenciación adipogénica	45
5.11.	Diferenciación condrogénica	46
5.12.	Diferenciación osteogénica	46
5.13.	Cultivo en suspensión con α -MEM antiOX y α -MEM antiOX enriquecido bajo normoxia	49
5.14.	Visualización de cultivo en suspensión con <i>microcarriers</i>	50
B.1.	Histogramas para muestras incubadas con isotipo IgG1	72
B.2.	Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD45 y PE-anti CD34	73
B.3.	Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD90 y PE-anti CD105	74
B.4.	Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD44 y PE-anti CD73	75

B.5.	Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD19 y PE-anti HLA-DR	76
B.6.	Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD11b y PE-anti CD29 .	77

Abreviaciones

- **ACO2**
Enzima aconitasa 2
- **ALT**
Alanina aminotransferasa
- **α -MEM**
Minimum Essential Medium Alpha
- **ASCT**
Transportador de aminoácidos 2
- **Ciclo del TCA**
Ciclo del ácido tricarboxílico
- **CQA**
Atributos Críticos de Calidad
- **CPP**
Parámetros Críticos del Proceso
- **DMEM**
Dulbecco's Modified of Eagle's Medium
- **DPBS**
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
- **ECM**
Matriz extracelular
- **ETC**
Cadena transportadora de electrones
- **F12**
Medio *Ham's F12*
- **FC**
Fold change del número de células
- **GLUT**
Glucotransportador
- **hASC**
Células madre derivadas de tejido adiposo humano
- **hBSC**
Células madre de médula ósea humana
- **hESC**
Células madre embrionarias humanas
- **HIF**
Factor Inducible por Hipoxia
- **hMSC**
Células madre mesenquimales humanas
- **hPSC**
Células madre pluripotentes humanas
- **IMDM**
Iscove's Modified Dulbecco's Medium
- **QbD**
Calidad desde el Diseño
- **QTPP**
Perfil de la Calidad del Producto Objetivo
- **MA**
Atributos de los Materiales
- **MCT**
Transportador de monocarboxilato
- **ME**
Enzima mállica
- **NAC**
N-acetil-L-cisteína
- **Nam**
Nicotinamida
- **NAMPT**
Nicotinamida fosforribosiltransferasa
- **NMNAT**
Mononucleótido adenililtransferasas
- **OxPhos**
Fosforilación oxidativa
- **PARP**
Poly-ADP-Ribose Polymerase

- **PC**
Piruvato carboxilasa
- **PEG**
Polietilenglicol
- **PFK**
Fosfofructoquinasa
- **PPP**
Ruta de las pentosas fosfato
- **PDH**
Piruvato deshidrogenasa
- **PDK**
Piruvato deshidrogenasa quinasa
- **Pyr**
Piruvato
- **ROS**
Especies Reactivas de Oxígeno
- **RSM**
Metodología/Modelo de Superficie de Respuesta
- **SFB**
Suero fetal bovino
- **SFT**
Suero fetal de ternera
- **SNAT**
Transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio
- **UCP2**
Proteína desacopladora mitocondrial 2
- ***xeno-free***
Libre de xenógenos

Capítulo 1

Introducción

Las Células Madre derivadas de tejido Adiposo Humano o hASC (por sus siglas en inglés), son células multipotentes adultas que residen en un nicho perivascular [1], las cuales desde que fueron aisladas de la Fracción Vascular Estromal por primera vez por Zuk *et al.* [2], se han posicionado como una promesa en la ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, y terapia celular [3, 4], mostrando *homing* en los tejidos dañados, efectos inmunomoduladores, generación de microambientes favorables para la regeneración gracias a la liberación de secretoma adiposo, y diferenciación en distintos tipos celulares [5].

Dentro de las posibilidades de especialización celular, poseen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos, por lo que las hASC entran en la clasificación de Células Madre Mesenquimales (MSC), las cuales se originan a partir de pericitos y se liberan de la membrana basal que envuelve los vasos sanguíneos al perder su anclaje perivascular [6]. Además, posee la capacidad de adherirse al plástico mostrando una morfología fibroblastoide [7], y presenta un perfil de expresión de antígenos de superficie característico determinado por citometría de flujo: CD45⁻, CD235a⁻, CD31⁻, CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺ y CD105⁺. Estas 3 propiedades (potencial de diferenciación, dependencia de anclaje y marcadores de superficie) son los criterios mínimos para tipificar a las hASC según La Federación Internacional de Terapias y Ciencias Adiposas (IFATS) y la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) [8].

El tejido graso puede ser extraído desde desechos quirúrgicos, por ejemplo, de los procedimientos de cirugía estética de dermolipectomía abdominal, técnicas que son poco invasivas y permiten coleccionar un tejido a partir del cual es posible aislar las células con un alto rendimiento [9]. Por lo anterior, el tejido adiposo ha pasado a ser una mejor alternativa de reserva de células madre en comparación a la médula osea, mostrando una frecuencia celular 500 veces mayor en ensayos de clonogenicidad a partir de 1 g de tejido [10]. En particular, a partir de 1 g de lipoaspirado es posible aislar 0,5-2 millones de células nucleadas de las cuales el 1-10% son hASC [11], sin embargo, para tener efectos terapéuticos se requieren del orden de 200 millones de MSC [12] hasta billones de células [13], frente a lo cual una alternativa es cultivarlas y expandirlas *in vitro* hasta alcanzar cantidades pre-clínicas y clínicas [14, 15].

En particular, las células madres pueden ser expandidas *in vitro* por medio de 2 estrategias: sistema “*scale-out*” y sistema “*scale-up*” [16]. El sistema “*scale-out*” consiste en mantener el tamaño del cultivo (superficie y/o volumen) y aumentar el número de unidades en paralelo utilizando convencionalmente placas de cultivo en 2-D, mientras que el sistema “*scale-up*”

consiste en aumentar el tamaño del cultivo (volumen y/o superficie) a medida que el número de células asciende utilizando convencionalmente cultivos 3-D [16, 17]. En particular, utilizando cultivos 2-D se ha podido alcanzar 540 millones de hASC en una factoría de células de 36 pisos [18], mientras que utilizando cultivos 3-D estáticos se ha podido alcanzar 605 millones de hASC en un biorreactor comercial (*Quantum Cell Expansion System*) de fibra hueca (*hollow fibers*) [19, 20], y en cultivos 3-D dinámicos se ha podido obtener hasta 1.600 millones de hASC en un biorreactor de un solo uso (BioBLU® 5c *Single-use Vessels*) utilizando *microcarriers* [21].

De todas formas, la proliferación de hASC posee una cinética baja, donde se han estimado tiempos de duplicación de 45 horas que se incrementan considerablemente a 55-90 horas desde el 6° pasaje del cultivo [22]. Además, la cinética de crecimiento de MSC depende de las características de los donantes [12]. Se ha reportado, por ejemplo, que MSC provenientes de diferentes donantes alcanzan distintas densidades celulares máximas aunque crezcan bajo la misma estrategia y parámetros de cultivo [12]. Por otro lado, las MSC no son capaces de proliferar infinitamente sino que se estima que posterior a las 30-40 duplicaciones entran en un estado de senescencia replicativa generando heterogenicidad del cultivo celular tanto morfológicamente (más grandes y aplanadas), fenotípicamente (alteración en la expresión de marcadores de superficie) y funcionalmente (alteración en el potencial de diferenciación) [23].

Por lo anterior, a pesar de que existan tecnologías atractivas para la producción a gran escala de MSC es necesario optimizar y estandarizar una serie de variables para el desarrollo de un bio-proceso de alto rendimiento [12]. En particular, para la manufactura de productos derivados de MSC se puede aplicar el concepto de “Calidad desde el Diseño” o *Quality-by-Design* (QbD) [24], un enfoque científico basado en el diseño de procesos relacionando propiedades del producto y parámetros/condiciones de operación con la calidad final del producto [24, 25]. El enfoque QbD define: el Perfil de la Calidad del Producto Objetivo (QTPP), por ejemplo, la dosis terapéutica de MSC; los Atributos Críticos de Calidad (CQA), por ejemplo, cantidad y viabilidad de MSC; los Parámetros Críticos del Proceso (CPP) y Atributos de los Materiales (MA), por ejemplo, niveles de metabolitos en el cultivo; el Espacio de Diseño que optimice los CQA, utilizando modelos estadísticos y/o de sistemas celulares; y la Estrategia de Control para mantener las operaciones dentro del espacio de diseño [24, 25, 26].

De esta forma, integrando tecnologías de expansión celular 2-D y 3-D junto con el uso de modelos matemáticos propuestos por el QbD para mejorar las condiciones de cultivo, sería posible optimizar la producción de hASC para alcanzar cantidades significativas para su uso terapéutico.

Capítulo 2

Objetivos y limitaciones

2.1. Objetivos

General:

Incrementar la cinética de crecimiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano mediante el enriquecimiento del medio de cultivo y el uso de condiciones de normoxia e hipoxia, conservando las propiedades fenotípicas y el potencial de diferenciación de las células.

Específicos:

1. Evaluar el impacto de distintas concentraciones de piruvato y nicotinamida sobre el crecimiento y el metabolismo de hASC cultivadas en monocapa bajo normoxia e hipoxia.
2. Maximizar la proliferación de hASC cultivadas en monocapa bajo normoxia e hipoxia utilizando medio enriquecido en piruvato y nicotinamida, y seleccionar las mejores condiciones de cultivo.
3. Corroborar la mantención de las características fenotípicas y del potencial de diferenciación de hASC cultivadas en monocapa en el medio enriquecido bajo la condición de oxígeno seleccionada.
4. Estudiar el desempeño del medio enriquecido en un cultivo en suspensión de hASC bajo la condición de oxígeno seleccionada.

2.2. Limitaciones

- Debido al acotado tiempo para la realización del trabajo de tesis, no se probará el enriquecimiento de componentes adicionales al piruvato y nicotinamida en el medio de cultivo, evitando la realización de gran cantidad de experimentos y el uso excesivo de materiales.
- La metodología de optimización puede mostrar un óptimo local y no necesariamente uno global, por lo tanto, la determinación de las concentraciones óptimas de piruvato y nicotinamida quedará sujeta a la definición del dominio experimental.

- Los estados metabólicos de hASC se estudiarán únicamente con las concentraciones de sustratos y metabolitos en el medio de cultivo, por lo tanto, la discusión respecto a reacciones de vías metabólicas intracelulares quedará sujeta a la interpretación de las tasas de consumo y producción de los componentes medidos en el medio de cultivo.
- La medición de concentración de piruvato y nicotinamida en el medio de cultivo estará limitada a los reactivos de cuantificación disponibles y al correcto uso de los mismos. Por lo anterior, en los cultivos donde no será posible medirlos, no se podrá confirmar ni descartar que corresponden efectivamente a sustratos consumidos por hASC. De todas formas, el impacto del enriquecimiento del medio de cultivo si será evaluado mediante la estimación de parámetros de crecimiento y metabolismo celular.

Capítulo 3

Marco teórico

3.1. Metabolismo de células madre

Las células madres poseen un metabolismo glucolítico elevado, lo cual se da para obtener un mayor aprovechamiento de la glucosa en vías biosintéticas en la generación de una nueva célula, y no oxidar la fuente de carbono completamente en CO_2 , fenómeno denominado glicólisis aeróbica o Efecto Warburg [27], que fue descrito por primera vez por Otto Warburg *et al.* en 1927 estudiando el comportamiento metabólico de las células tumorales [28].

El alto flujo glicolítico permite generar intermediarios de vías anabólicas como la glucosa-6-fosfato para la ruta de las pentosas fosfato (PPP), el 3-fosfoglicerato para la formación de aminoácidos como serina y metionina, la dihidroxiacetona fosfato para la síntesis de lípidos, la fructosa-6-fosfato para la biosíntesis de hexosamina utilizada en la glicosilación de proteínas, junto con ATP y piruvato como moléculas energéticas [29, 30]. Además de aportar bloques de construcción para macromoléculas, por medio de una glicólisis elevada existe una mayor generación de precursores de antioxidantes provenientes de la PPP, los cuales actúan como especies citoprotectoras al minimizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) [32].

Posterior a la glicólisis, se estima que el 5-10 % del piruvato se desvía a la mitocondria mientras que el 85 % es convertido a lactato y exportado fuera de la célula por el transportador de monocarboxilato 4 (MCT 4), lo que disminuye las contribuciones al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la fosforilación oxidativa (OxPhos) [33]. Esto puede deberse a: una sobreexpresión de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) que convierte el piruvato en lactato en el citosol para producir nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) utilizada en la glicólisis [34]; una regulación a la baja de la expresión de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) encargada de convertir el piruvato en acetil-coenzima A (acetil-CoA) en la mitocondria [30]; y una sobreexpresión de la proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP2) presente en la membrana interna de la mitocondria que actúa como *gatekeeper* o guardián de la entrada de piruvato a la mitocondria [35] que se presume exporta el piruvato al exterior de la mitocondria [36], o exporta intermediarios del ciclo del TCA (oxaloacetato y otros), lo cual regula negativamente la captación y oxidación del piruvato a acetil-CoA [37].

El piruvato que logra entrar al compartimento mitocondrial se transforma en acetil-CoA y posteriormente en citrato, el cual se exporta en gran medida al citosol para la síntesis *de novo* de ácidos grasos [30], de hecho en cultivos celulares, el acetil-CoA derivado de la glucosa es la principal fuente de carbono para la biosíntesis de lípidos [38]. En particular, en las

células madre pluripotentes embrionarias la enzima aconitasa 2 (ACO2) del ciclo del TCA está regulada a la baja, provocando que la conversión de citrato a α -cetoglutarato (α -KG) esté altamente limitada [30, 31]. Por lo anterior, se recurre a glutamina que ingresa a la célula a través del transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 1 (SNAT-1) y el transportador de aminoácidos 2 del sistema alanina-serina-cisteína (ASCT-2) vía co-transporte con sodio (Na^+) [39, 40] y es hidrolizada a glutamato por la enzima glutaminasa, y luego es transformada en α -KG por una desaminación o transaminación [41], lo cual permite completar el último tramo del ciclo del TCA [30].

El rol canónico del ciclo del TCA es generar factores reductores y donantes de electrones (NADH y FADH_2) para suministrar la cadena transportadora de electrones (ETC) y la síntesis de ATP mediante OxPhos [42], sin embargo, complementariamente a la generación de energía, mantiene un equilibrio entre la anaplerosis que involucran reacciones para reponer los intermediarios del ciclo del TCA utilizando principalmente piruvato y glutamina, y la cataplerosis que involucran procesos mediante los cuales se pueden extraer intermediarios parcialmente oxidados para vías anabólicas, entre ellas, biosíntesis de lípidos, aminoácidos y nucleótidos, así como modificación post-traducciona de proteínas [42]. Este balance es crítico para la regulación de las funciones de células madre [42].

La Figura 3.1 resume el metabolismo central de células madre.

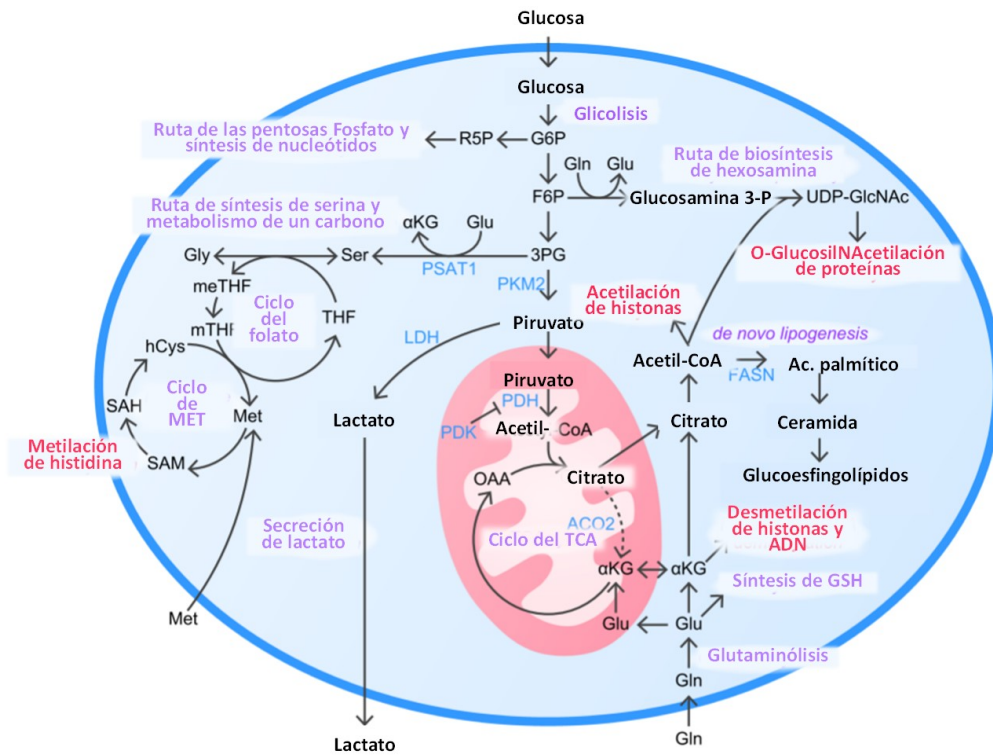


Figura 3.1: Metabolismo de células madre. La glucosa es utilizada para la biosíntesis de nucleótidos, aminoácidos, y hexoamina. El piruvato es altamente reducido a lactato para restaurar el NAD^+ y mantener el flujo glicolítico, mientras que el piruvato que entra al ciclo del TCA es convertido en citrato para la síntesis de lípidos. El ciclo del TCA se completa por el ingreso de glutamina que da origen al α -KG. Adaptado de [30].

3.1.1. Estado quiescente, proliferativo y diferenciado

La mayoría de las células madre adultas permanecen en un estado de quiescencia sin dividirse a menos que exista un estímulo estresante o una lesión y respondan entrando al ciclo celular, proliferando y diferenciándose en linajes específicos para reparar el tejido [29, 43] (ver Figura 3.2), incluso se ha reportado que algunas células madre en estado quiescente llegan a duplicarse cada 4-5 meses [44]. Las células madre quiescentes por lo general residen en entornos hipóxicos en lo profundo de los tejidos y exhiben una actividad glucolítica elevada y una actividad mitocondrial baja lo cual permite minimizar la producción de ROS generados en OxPhos, prevenir un estrés oxidativo, y garantiza la mantención de las células madre a largo plazo [29, 43, 45]. Este metabolismo característico es mediado por una sobreexpresión del factor inducible por hipoxia (HIF), un factor de transcripción que regula al alza la expresión de las piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) 2 y 4 que fosforila e inactiva a la PDH [43, 44].

La transición de un estado quiescente a uno proliferativo se asocia a un aumento de la biogénesis mitocondrial y el nivel de OxPhos para satisfacer una mayor demanda energética [45]. Esta transición además está caracterizada por la migración de un nicho hipóxico a un ambiente rico en oxígeno [43]. Se ha reportado que hMSC cultivadas en normoxia dependen de OxPhos y de un alto consumo de oxígeno, y muestran una elevada tasa proliferativa [43]. En particular, la presencia de oxígeno aumenta la actividad mitocondrial y la producción de ROS que se cree induce la proliferación de células madre [29, 43, 44], y la diferenciación [44], sin embargo, aberrantes niveles de ROS pueden provocar daños en el ADN, envejecimiento de las células madre [44], y apoptosis [43].

En un ambiente con mayor tensión de oxígeno, los niveles de HIF disminuyen por una degradación proteasómica, lo que a su vez reduce la expresión de las PDK 2 y 4 favoreciendo la oxidación del piruvato en acetil-CoA, el cual alimenta el ciclo del TCA [43]. Paralelamente, las PDK están reguladas alostéricamente por las moléculas de piruvato, ATP, AMP, acetil-CoA y NADH [46, 47]. En particular, las proporciones bajas de ATP/ADP, acetil-CoA/CoA y NADH/NAD⁺ inhiben las PDK [46], de esta forma, la PDH y el destino del piruvato también dependen del contenido de metabolitos, los niveles de ATP y el estado redox [46].

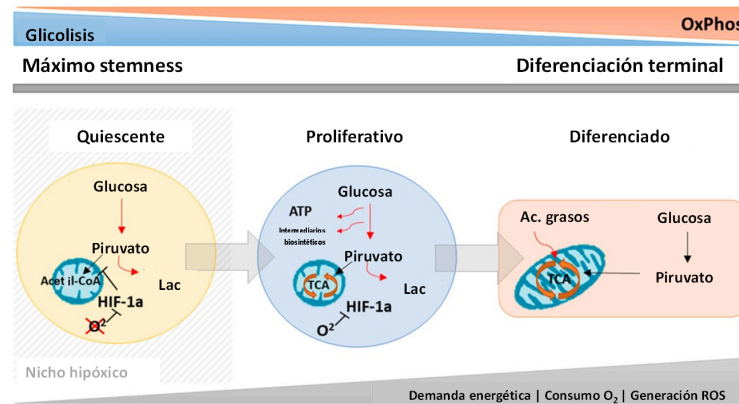


Figura 3.2: Células madre quiescentes, proliferativas y diferenciadas. En estado quiescente predomina la glicólisis debido a la actividad del HIF en hipoxia con baja generación de ROS para mantener las propiedades troncales (*stemness*). Fuera del nicho hipóxico, aumenta OxPhos y los niveles de ROS, que estimulan la proliferación y diferenciación. Adaptado de [43].

3.2. Medios de cultivo para células madre

Para garantizar un rápido crecimiento de células madre *in vitro* manteniendo su fenotipo y potencial de diferenciación es necesario identificar formulaciones de medio de cultivo apropiadas [48, 49]. A continuación, se describen algunos medios de cultivo basales utilizados para la expansión de MSC:

- ***Dulbecco's Modified of Eagle's Medium (DMEM)***: fue formulado en sus inicios para la propagación de partículas virales [49, 50], sin embargo, ha sido ampliamente utilizado para la expansión de hMSC [51]. Este medio es una modificación a la formulación desarrollada por Eagle (*Minimum Essential Medium -MEM-*) [50, 52] donde se cuadruplica la concentración de 13 aminoácidos “esenciales” y 8 vitaminas [50]. El medio DMEM comercial puede contener 5,5 mM o 25 mM de glucosa [53, 54].
- ***Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)***: fue formulado inicialmente para el crecimiento de linfocitos e hibridomas [55], pero se ha utilizado en la expansión de MSC [56, 57]. Es una modificación de DMEM con adición de selenio, y más aminoácidos, vitaminas y sales inorgánicas [55, 58], junto con *buffer* HEPES y piruvato de sodio [55]. El medio IMDM comercial puede contener 25 mM de glucosa [59].
- **Medio *Ham's F12 (F12)***: fue formulado inicialmente para el crecimiento de células de Ovario de Hamster Chino (CHO) [49], y es utilizado en combinación con otros medios para el crecimiento de MSC [48, 49]. Este medio es una modificación de la formulación *Ham's F10* que utilizaba albúmina y fetuina, los cuales son cambiados por componentes químicamente definidos (ácido linoleico y putrescina) [60, 61] para generar cultivos con bajo contenido de suero [49]. El medio F12 comercial posee una concentración de glucosa de 10 mM [62].
- **DMEM/F12**: es una mezcla 1:1 de los medios DMEM y F12 donde se aprovecha la amplia gama de ingredientes presentes en F12, y la alta concentración de componentes específicos en DMEM, lo que permite suplir los requerimientos nutricionales de múltiples células [49, 60], incluidas las hMSC [49]. El medio DMEM/F12 comercial posee un contenido de glucosa de 17,5 mM [63].
- ***Minimum Essential Medium Alpha (α -MEM)***: fue formulado inicialmente para el cultivo de una línea celular híbrida de ratón y hamster [64], sin embargo, es uno de los más utilizados para crecimiento de hMSC [51]. Es una modificación a la formulación de Eagle donde se incorporan aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, vitaminas como ácido ascórbico, biotina, y ácido fólico, además de nucleósidos [64, 65]. El medio α -MEM comercial posee bajo contenido de glucosa al 5,5 mM [65].
- **Medio StemPro™ XenoFree**: fue formulado por Life Technologies™ para el crecimiento de hMSC en un medio de cultivo libre de suero y xenógenos (*xeno-free*), es decir sin componentes provenientes de animales [66]. hASC cultivadas en este medio de cultivo ha mostrado tasas de proliferación elevadas manteniendo el potencial de diferenciación y el perfil de expresión de marcadores de superficie [67].

Los medios de cultivo basales más utilizados para la expansión de MSC, de acuerdo a reportes de ensayos clínicos (excluyendo *xeno-free*), son DMEM (baja glucosa) y α -MEM

[57]. En la misma línea, según la tesis de Lorna León sobre cultivos de hASC, el medio de cultivo α -MEM reporta las mayores tasas específicas de crecimiento y los menores tiempos de duplicación [68].

La glucosa es uno de los componentes clave de los medios de cultivo basales, y es la principal fuente de carbono para las MSC, la cual puede estar en concentraciones fisiológicas (5,5 mM) o superiores [56]. Se sabe que los ambientes con altos niveles de glucosa reducen la capacidad proliferativa de células madre, donde se ha reportado que una exposición a hiperglicemia provoca alto contenido de ROS intracelular y senescencia celular [69]. La glutamina es una segunda fuente de carbono que puede estar presente en concentraciones de 2–4 mM, y es favorable para el crecimiento de las MSC [56]. Sin embargo, la glutamina es inestable a 37°C y se degrada espontáneamente formando amonio que posee efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular, por lo tanto, se recomienda utilizar GlutaMAX, un dipéptido L-alanina-L-glutamina [56] que es más estable en soluciones acuosas [57].

3.2.1. Suero, reemplazo de suero animal, y medios libres de suero

Un suplemento importante de los medios de cultivo de MSC es el suero [56, 70, 71]. El suero es una mezcla compleja de proteínas, factores de adhesión, factores de crecimiento, hormonas, ácidos grasos, lípidos, minerales, aminoácidos, y vitaminas [70, 72], que promueven la adhesión celular (*attachment*) y la proliferación celular *in vitro* [70]. Los sueros más utilizados son el suero fetal bovino (SFB) y suero fetal de ternera (SFT) en concentraciones de 10-20 % v/v [71], sin embargo, también se ha utilizado medios con bajo contenido de suero (5 %) reportando un crecimiento satisfactorio de MSC [71]. En particular, para la generación de productos derivados de MSC, la reducción del contenido de suero permite reducir los costos del proceso, simplifica el *downstream processing* y facilita la aprobación del producto [71].

El suero es un riesgo cuando las MSC se utilizan en aplicaciones clínicas, esto porque el SFB y SFT provienen de animales pudiendo contener contaminantes (virus, priones, endotoxinas) y provocar inmunogenicidad y alergenicidad [56, 70, 72]. Además, al ser una mezcla compleja que varía de lote a lote [56, 70], existen variables desconocidas que dificultan la estandarización del proceso [70] y la reproducibilidad del rendimiento del cultivo [72]. Una alternativa, es reemplazar el suero de origen animal por suero de origen humano y sus derivados como el lisado de plaquetas, sin embargo, posee las mismas limitaciones al ser lote dependiente [56]. Por lo anterior, la alternativa más conveniente es el uso de formulaciones libres de suero y formulaciones químicamente definidas [56, 70], suplementando, por ejemplo, con albúmina de suero humano, transferrina humana, insulina humana, entre otros [70].

3.2.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son suplementos bioquímicos que protegen a las células del estrés oxidativo neutralizando radicales libres y peróxidos [73]. En particular, las ROS son necesarias para mantener la capacidad autoregenerativa de las células madre, sin embargo, altos niveles causan daños en el ADN, ARN y proteínas celulares [73]. Las ROS se producen por reacciones bioquímicas de las células, sin embargo, también pueden generarse por oxidación de algunos componentes del medio de cultivo como flavonoides, tioles, polifenoles y ascorbato [72, 74]. Se ha reportado incluso que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por oxidación del

ascorbato puede reaccionar con otros compuestos del medio provocando su pérdida [74].

Entre algunos antioxidantes utilizados para reducir el estrés oxidativo en células madre se encuentran: polietilenglicol (PEG) catalasa, N-acetil-L-cisteína (NAC), selenito, putrescina, y etanolamina [73, 68, 75, 76, 77]. En particular, de acuerdo a la tesis de Lorna León, el NAC (0,1 mM), el selenito de sodio (29 mM), la putrescina (0,018 mg/L) y la etanolamina (1,7 mM) poseen efectos favorables en el crecimiento de hASC [68].

3.3. Estrategias de bio-procesos para cultivos de células madre

Las MSC son altamente sensibles a su entorno interactuando con células circundantes, matriz extracelular (ECM), y moléculas bio-activas [56]. Los factores más influyentes en el crecimiento, propiedades, y fenotipos específicos de interés de las células madre corresponden a los Parámetros Críticos del Proceso (CPP) para la expansión *in vitro* de MSC [56]. Entre algunos CPP se encuentran la superficie de crecimiento, condiciones de cultivo, y componentes del medio de cultivo [56]. En esta sección, se muestran estrategias de bio-procesos para el cultivo de células madre asociadas a los tres CPP mencionados anteriormente.

3.3.1. Cultivos 2-D y 3-D

Los métodos tradicionales para expandir células madre corresponden a técnicas de cultivo en 2 dimensiones (2-D) o monocapa, y en 3 dimensiones (3-D) en multicapa o suspensión [78] (ver Figura 3.3). A continuación, se especifican algunas de sus características:

- **Cultivo en monocapa (2-D):** se utilizan placas de cultivo de plástico donde las células crecen en monocapa, y para escalar el sistema se requiere una rutina continua de pasajes (*passaging*) [78], y/o una factoría de células de múltiples pisos utilizando matraces de tipo T-*flask* uno sobre otro, formando unidades de 1 a 40 pilas [12]. En particular, la transferencia de masa de los nutrientes en cultivos en monocapa se basa únicamente en la difusión, que es más ineficiente que la transferencia por convección [79, 80]. Esta técnica de cultivo no permite alcanzar altas densidades celulares ni rendimientos, además puede haber alteraciones morfológicas, sin embargo, es útil para generar protocolos estandarizados de ensayos de análisis desde microscopía hasta recuento celular [78].
- **Cultivo 3-D:** imita las interacciones *in vivo* entre las células y la matriz extracelular (MEC) y se basan en el uso de biorreactores con condiciones de cultivo controladas [78], los que pueden ser de tipo: lecho empacado (*packed-bed*), donde las MSC crecen en multicapa sobre una cama de gránulos de poliestireno biocompatible, perlas de vidrio o materiales fibrosos; fibra hueca (*hollow fiber*), donde las MSC crecen en multicapa entre fibras semi-permeables imitando los capilares sanguíneos, donde el medio de cultivo fluye en el interior de las fibras y difunde hacia el espacio intersticial; *spinner flask*, donde las MSC crecen en suspensión con ayuda de un impulsor interno que permite la agitación radial del medio de cultivo; y tanque agitado (*stirred-tank*), similar a *spinner flask* pero con agitación radial y/o axial y a mayores escalas [71, 78, 79]. Las MSC que crecen en suspensión pueden hacerlo adheridas sobre una superficie móvil en forma de *microcarriers* o pueden formar agregados celulares en forma de esferoides [71].

En ambas técnicas, se deben considerar las diferencias en las fuerzas motrices que gobiernan la transferencia de masa en el medio, las cuales pueden limitar significativamente el acceso a los nutrientes [80, 81, 82], y además se debe tener en cuenta que el anclaje sobre distintas matrices ejerce una mecano-regulación sobre el comportamiento de las células, como migración, diferenciación, proliferación, y el metabolismo celular [70, 83, 84]. Respecto a la regulación del metabolismo, la adherencia a sustratos rígidos permiten la extensión de fibras de actina que capturan la ubiquitina ligasa responsable de la degradación proteasomal de la fosfofructoquinasa (PFK), lo que permite mantener la glicólisis [84].

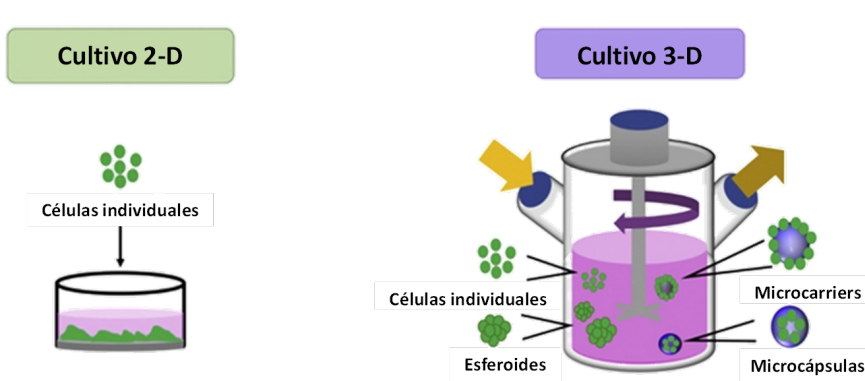


Figura 3.3: Representación de técnicas de cultivo de células madre. A la izquierda, cultivo en monocapa, y a la derecha, cultivo en suspensión. Adaptado de [78].

3.3.1.1. Cultivos en suspensión con *microcarriers* y esferoides

Los *microcarriers* son perlas pequeñas que tienen un diámetro de 90-380 μm [71] y ofrecen una gran superficie por volumen para células que son dependientes de anclaje (ver Figura 3.4) [78, 12], y se han utilizado en concentraciones que van desde 1 g/L hasta 32 g/L para cultivos de hMCS [80]. Los *microcarriers* disponibles comercialmente están hechos de varios materiales (ver Tabla 3.1), siendo el poliestireno y dextrano los más utilizados [85]. En particular, las perlas de poliestireno como SoloHill® (Sartorius®) y de dextrano como Cytodex® 1 y 3 (GE Healthcare) brindan especificaciones precisas y pruebas de control de calidad, por lo tanto, son los más preferidos, por ejemplo, para el cultivo de células madre pluripotentes [85].

Los tamaños de *microcarriers* mayormente preferidos para el cultivo de células madre oscilan entre 100 y 250 μm . En particular, los más pequeños se pueden utilizar en cantidades más elevadas al interior de un biorreactor generando un área de superficie de crecimiento mayor en comparación con los *microcarriers* más grandes. Sin embargo, los *microcarriers* más grandes como Cytodex® 1 y 3 reducen el riesgo de agregación de los mismos favoreciendo así la proliferación [85]. Una alternativa para evitar la agregación de las células es adicionar periódicamente *microcarriers* frescos al cultivo para aumentar la superficie de crecimiento y favorecer la migración de las células hacia los *microcarriers* “desnudos” [80].

La adhesión (*attachment*) de las células a los *microcarriers* durante la inoculación del cultivo en suspensión es una etapa crítica considerando que la adhesión es más compleja en comparación a placas de cultivo 2-D principalmente por la curvatura de su superficie [80] (ver Tabla comparativa 3.2). En particular, los *microcarriers* Cytodex® 1 han mostrado tener la

mejor eficiencia para la adhesión de células madre de médula ósea (hBSC) [13]. Además de la adhesión celular a los *microcarriers*, también es crítica una correcta colonización de los mismos donde se evalúa la tasa de utilización de la superficie de cultivo, la que podría afectar el rendimiento celular final [13]. Por lo general, durante la inoculación se utiliza una tasa de colonización de 3-6 células por *microcarrier* o 3.000-5.000 cel/cm² [13]. De todas formas, si se desea aumentar la eficiencia de colonización se recomienda inocular una mayor cantidad de células madre en vez de disminuir el número de *microcarriers* en el cultivo [13].

Para mejorar la adhesión celular en cultivos en suspensión con *microcarriers* se ha utilizado la agitación intermitente que ha demostrado ser más eficiente que la agitación continua posterior a la inoculación [13, 79]. Se ha reportado que utilizar un patrón de 3 min de agitación seguido de 27 min de reposo (durante 24 h) mejora la eficiencia de adhesión de hMSC 1,5 a 2 veces más que una agitación ininterrumpida [13, 79]. Posteriormente, durante la expansión celular es necesario mantener un nivel de agitación óptimo para disminuir los esfuerzos de corte y la agregación de hMSC. Se recomienda utilizar velocidades de agitación suficientemente bajas como las requeridas para que exista una correcta transferencia de masa y los *microcarriers* no se acumulen en zonas muertas [13]. La velocidad de agitación mínima requerida para mantener los *microcarriers* en suspensión puede estimarse de forma sencilla por visualización [13]. En particular, las velocidades más bajas reportadas para cultivos de hASC en suspensión con *microcarriers* van desde las 25 rpm hasta las 60 rpm [13].

Tabla 3.1: Características de *microcarriers* comerciales [13, 71]

Tipo	Diámetro (μm)	Densidad (kg/m ³)	Superficie (cm ² /g)	Carga	Matriz/Revestimiento
CultiSpher-G	130-380	1020	-	ninguna	Gelatina / ninguno
CultiSpher-S	130-380	1020	-	ninguna	Gelatina / ninguno
Cytodex 1	147-248	1030	4400	+	dextrano reticulado / dietilaminoetilcelulosa
Cytodex 3	141-211	1040	2700	ninguna	dextrano reticulado / colágeno
Collagen	90-150/125-212	1020	480/360	ninguna	poliestireno reticulado / colágeno
FACT III	90-150/125-212	1020/1040	480/360	+	poliestireno reticulado / colágeno
Hillex II	160-180	1110	515	+	poliestireno modificado / trietilamina
Hillex-CT	160-180	1110	515	+	poliestireno modificado / trimetilamonio catiónico
Plastic	90-150/125-212	1020/1040	480/360	ninguna	poliestireno reticulado / ninguno
Plastic Plus	90-150/125-212	1020/1040	480/360	+	poliestireno reticulado / ninguno
ProNectin F	90-150/125-212	1020/1040	480/360	ninguna	poliestireno reticulado / fibronectina recombinante
Glass	90-150/125-212	1020/1040	480/360	ninguna	poliestireno reticulado / vidrio

Una alternativa al uso de *microcarriers* es la formación de agregados celulares o esferoides [71]. Los esferoides se forman inicialmente por la interacción de las MSC con componentes de

la matriz extracelular (ECM) generando masas aisladas de pequeños grupos celulares, esta interacción provoca una mayor expresión de ECM favoreciendo las conexiones célula-célula, lo que aumenta la densidad celular y genera la formación de un agregado multicelular en forma de esferoide (ver Figura 3.4) [87]. Para favorecer la formación de esferoides en cultivos en suspensión se debe utilizar una gran densidad de células y una agitación permanente, lo que maximiza el contacto célula-célula y minimiza la adhesión a la superficie sólida del cultivo [88]. La estructura del esferoide comprende 3 zonas: externa, donde las células proliferan; intermedia, donde las células no proliferan; e interna, donde hay células apoptóticas y necróticas debido al limitado acceso a los nutrientes y acumulación de desechos metabólicos [87]. Uno de los mayores desafíos es controlar el tamaño del esferoide ya que un esferoide grande genera la formación del centro con muerte celular, sin embargo, al disminuir considerablemente el tamaño se puede provocar la desagregación del esferoide en células individuales [89].

Tabla 3.2: Tabla comparativa cultivo en monocapa y en suspensión con *microcarriers*. Adaptado de [86]

Componentes del ambiente de cultivo		Cultivo en monocapa	Cultivo con <i>microcarriers</i>
Superficie	Rigidez	Rígido	Variado
	Geometría	Plano	Curvo
Entorno endógeno	Interacciones célula-célula	Alto	Bajo
	Acumulación de ECM	Alto	Bajo
	Acumulación de factores de crecimiento	Alto	Bajo
	Efectos paracrinos	Alto	Bajo
Entorno circundante	Transporte primario	Difusión	Convección
	Distribución de O ₂ y nutrientes	Gradiente	Mezcla homogénea
	Esfuerzo de corte	Ninguno	Heterogéneo
	Colisiones célula-célula	Ninguna	Frecuente

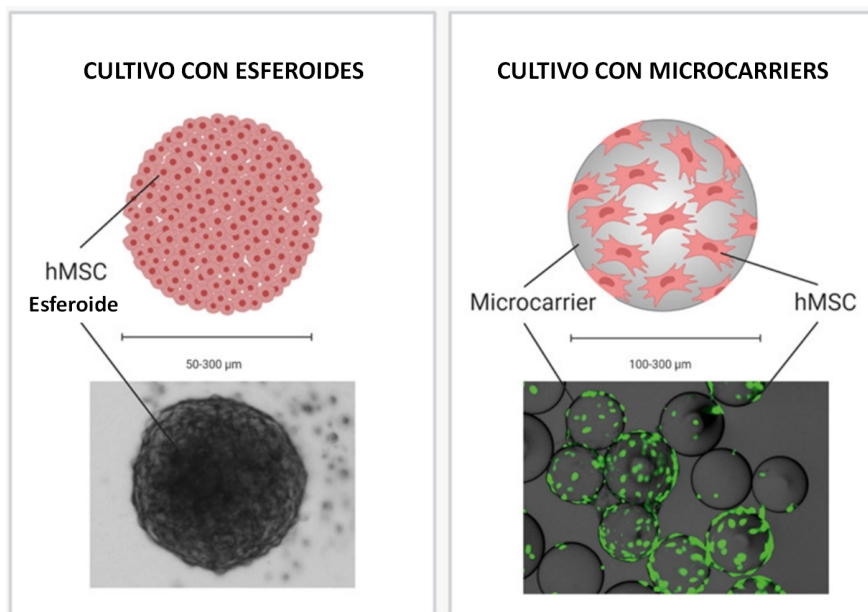


Figura 3.4: Cultivo de hMSC en base a *microcarriers* y esferoides. Adaptado de [89].

3.3.2. Condición de hipoxia

El oxígeno es un sustrato clave en la bio-energética de células mamíferas que dicta la eficiencia metabólica [90], el cual ingresa a la célula por difusión a través de la membrana plasmática [91, 92]. En particular, un metabolismo aeróbico permite la producción teórica de 36 ATP a partir de 1 molécula de glucosa, actuando como aceptor final de electrones en OxPhos [90, 93]. Además, se sabe que el oxígeno es una molécula de señalización que regula la proliferación y la diferenciación de células madre [94].

El nicho *in vivo* de células madre mesenquimales se caracteriza por ser un ambiente hipóxico [32]. En particular, el tejido adiposo humano donde residen las hASC presenta una tensión de oxígeno significativamente menor (0,1-5 %) en comparación a ambientes atmosféricos (20-21 %) [95]. Esta condición, junto con el fenotipo glucolítico y quiescente de células madre mesenquimales *in vivo*, permite mantener la homeostasis celular al minimizar la producción de ROS [32], incluso se ha observado que la hipoxia favorece el efecto Warburg en células madre pluripotentes inducidas [96]. Por otro lado, cuando las células se cultivan en un medio rico en nutrientes induce un cambio metabólico caracterizado por un mayor acoplamiento entre la glucólisis con el ciclo del TCA y OxPhos, lo cual provoca un incremento en la liberación de ROS, disfunción mitocondrial, reducción de la actividad de autofagia, entre otros [32].

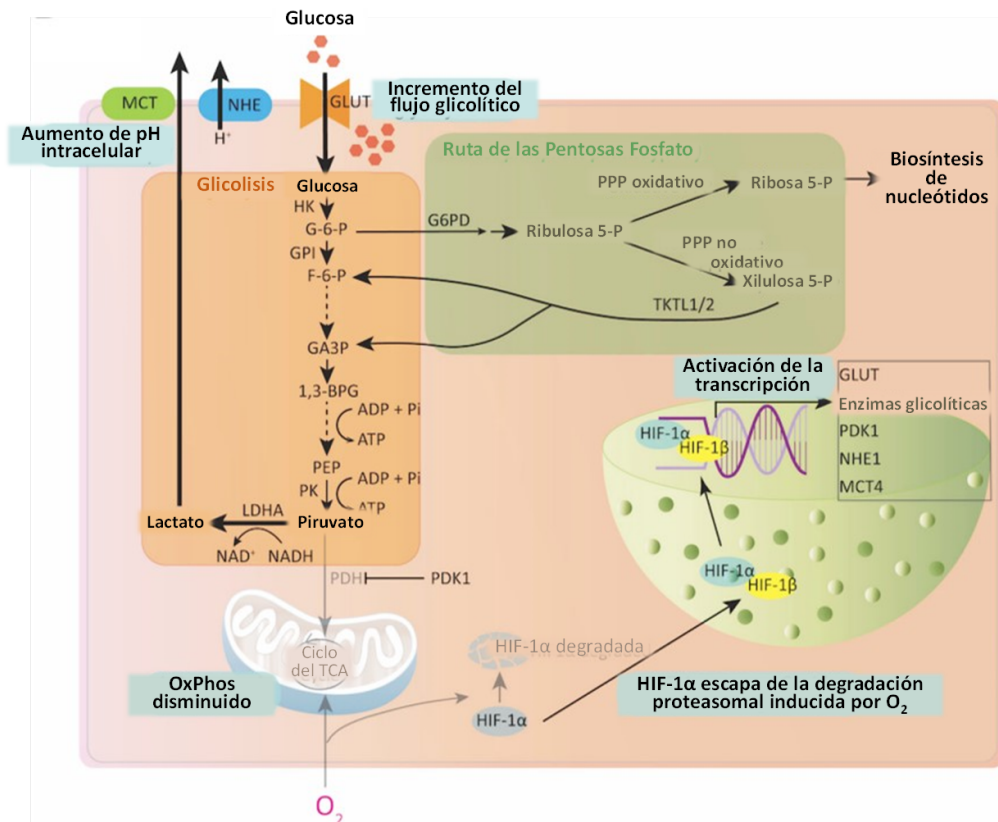


Figura 3.5: Metabolismo de MSC en hipoxia. En baja tensión de oxígeno el HIF-1 α transloca al núcleo, donde dimeriza con el HIF-1 β activando la transcripción de genes que expresan para transportadores de glucosa y enzimas que aumentan el flujo glucolítico y la producción de lactato (elevando el pH intracelular), mientras decrece OxPhos. Adaptado de [33].

Para mantener la homeostasis celular se ha utilizado ampliamente el cultivo hipóxico que permite mantener la glucólisis y suprimir el ciclo del TCA y la actividad de OxPhos, principalmente, a causa de la activación del gen del factor inducible por hipoxia (HIF-1) [32]. El HIF-1 (dímero entre HIF-1 α y HIF-1 β) se une al ADN induciendo la expresión de genes que participan de distintos procesos celulares como proliferación, diferenciación, secreción de factores solubles, y migración [95] (ver Figura 3.5). En particular, en cultivos hipóxicos las hASC muestran una mejora en la viabilidad y disminuyen el porcentaje de células apoptóticas en comparación a condiciones normóxicas, manteniendo el perfil de marcadores de superficie, y el potencial de diferenciación [95]. En particular, no existe consenso respecto a la hipoxia como una condición favorable para la proliferación de hASC. Por un lado, se ha reportado que la hipoxia eleva significativamente la tasa de proliferación de hASC [97], pero también los ambientes normóxicos [98].

3.3.3. Enriquecimiento del medio de cultivo

Los medios de cultivo, por lo general, deben ser enriquecidos para mantener un crecimiento prolongado de las células, esto significa elevar los niveles de algunos componentes del medio basal y mantenerlos relativamente constantes en el tiempo [99]. Sin embargo, un enriquecimiento elevado puede llevar a niveles inhibitorios del crecimiento [99], o paralelamente, concentraciones muy bajas pueden llevar a niveles sub-óptimos del crecimiento. Es por esto que se busca ajustar la composición del medio de cultivo a concentraciones óptimas de nutrientes y metabolitos para que la tasa de proliferación de las MSC pueda mejorarse [100]. Se sabe incluso que la composición del medio de cultivo puede afectar directamente los estados metabólicos de células madre e impactar en vías de señalización [101].

A continuación, se describen 2 sustratos de células madre presentes en medios de cultivo basales: el piruvato y la nicotinamida (para consultar concentraciones reportadas en publicaciones, ver Tabla 3.3).

3.3.3.1. Piruvato

El piruvato es un intermediario de diferentes vías metabólicas que se produce a partir de la glucólisis [42], el cual ingresa a la célula por difusión facilitada vía co-transporte con un protón (H⁺) a través del transportador de monocarboxilato 2 (MCT-2) [102, 103], y puede ser metabolizado en 6 compuestos diferentes: (1) acetyl-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDC), (2) lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), (3) oxaloacetato por la enzima piruvato carboxilasa (PC), (4) alanina por la alanina aminotransferasa (ALT), (5) malato por las enzimas málicas (ME), y (6) acetato por la α -cetoglutarato deshidrogenasa [29, 42, 46] (ver Figura 3.6). Se sabe que el piruvato incrementa el metabolismo energético, inhibe la senescencia replicativa [105], y su destino regula diferentes funciones en células madre pluripotentes humanas (hPSC) [42]. Incluso, el piruvato constituye la principal fuente de carbono y energía para células madre totipotenciales y, a medida que pierden su totipotencialidad, aumenta la preferencia por la glucosa [106].

En células madre gran parte del piruvato es transformado en lactato el cual posteriormente es secretado al medio extracelular, con lo cual se pierden carbonos que pudieron ser aprovechados en rutas de biosíntesis [107]. Además, existe una sobreexpresión de la proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP2) presente en la membrana interna de la mitocondria

que disminuye la oxidación de piruvato en el ciclo de TCA [35]. Sin embargo, el piruvato que logra entrar al compartimento mitocondrial se transforma en acetil-CoA y posteriormente en citrato que se utiliza en la síntesis *de novo* de ácidos grasos [30] (ver Figura 3.1).

Se ha reportado que al suplementar con piruvato exógeno cultivos de células madre embrionarias humanas (hESC) se favorece OxPhos y altera la expresión de genes asociados al metabolismo oxidativo [108]. En particular, la adición de piruvato ha mostrado regular al alza la expresión de los genes piruvato deshidrogenasa y piruvato carboxilasa del ciclo del TCA [109], y además se caracteriza por tener un rol citoprotector como antioxidante [110], teniendo una fuerte capacidad de eliminación de ROS, y protegiendo el potencial de la membrana mitocondrial [109]. Por otro lado, en cultivos de hASC en condición normóxica, el consumo de piruvato exógeno aumenta en bajos niveles de glucosa para aprovecharlo en el ciclo del TCA, mientras que en condición hipóxica, aumenta el consumo de piruvato exógeno en altos niveles de glucosa al predominar la glicólisis anaeróbica [98].

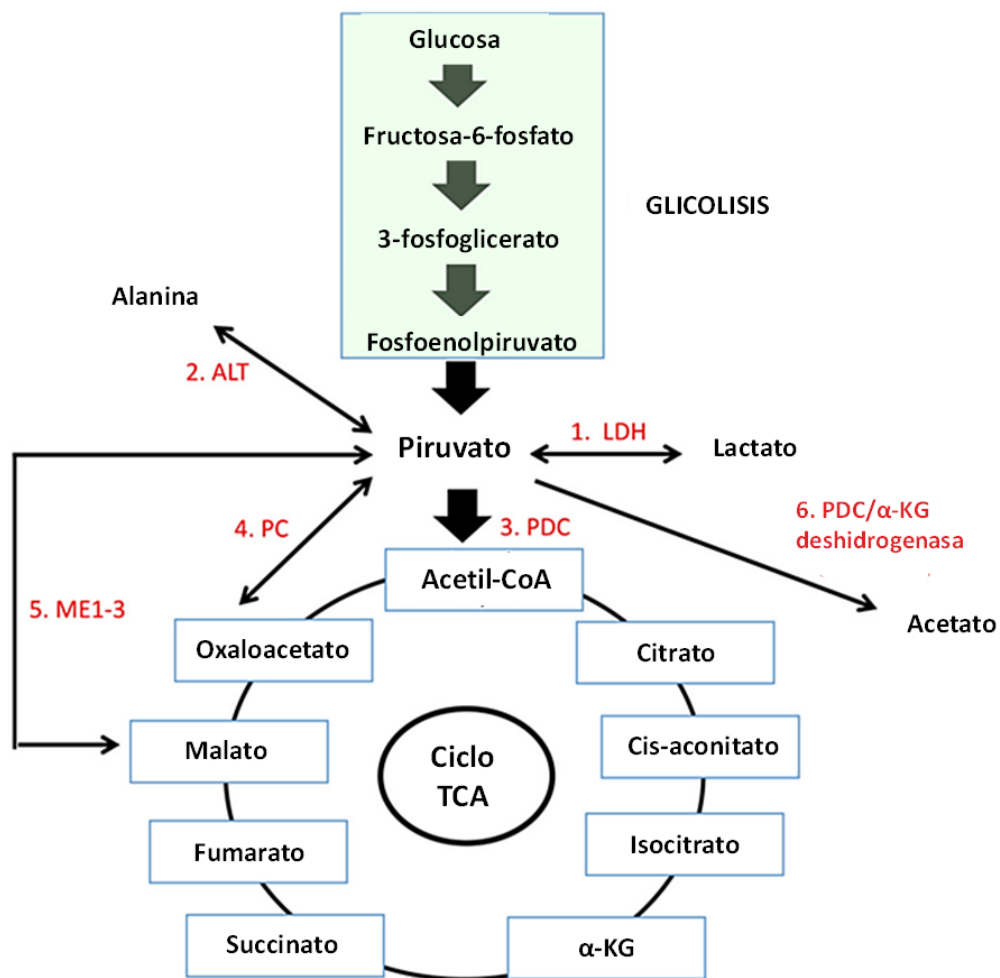


Figura 3.6: Destinos del piruvato. Puede ser transformado en lactato, acetato, acetil-CoA, oxaloacetato, malato, y alanina. Adaptado de [46].

3.3.3.2. Nicotinamida

La NAD^+ es una coenzima de deshidrogenasas, las cuales se encargan de catalizar reacciones de oxido-reducción en distintas rutas metabólicas como glucólisis, glutaminólisis, y oxidación de ácidos grasos [111], mientras que su forma fosforilada, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+), participa en la síntesis de ácidos nucleicos [96]. A nivel energético, NAD^+ actúa como aceptor de electrones reduciéndose a NADH , el cual posteriormente los dona a la cadena transportadora de electrones para la generación de ATP en células eucariotas [111]. Adicionalmente, la NAD^+ tiene un rol importante en la regulación de procesos y funciones celulares como la autofagia, mitofagia, y la expresión circadiana de importantes genes de rutas metabólicas [111].

Las células madre mesenquimales exhiben una actividad glucolítica elevada que permite la generación de bloques de construcción para macromoléculas pero también para la formación de precursores de antioxidantes, los cuales actúan como especies citoprotectoras al minimizar las ROS [32]. Para mantener este flujo glucolítico es necesario restaurar constantemente el NAD^+ por medio de la reducción del piruvato a lactato a través de la enzima lactato deshidrogenasa (ver Figura 3.7), la cual se encuentra sobreexpresada [30, 107]. De todas formas, se sabe que trascurridas múltiples generaciones durante la expansión de cultivos de células madre mesenquimales el nivel intracelular de NAD^+ disminuye progresivamente mientras NADH aumenta, lo cual provoca desregulación del metabolismo, disfunción mitocondrial, envejecimiento y senescencia replicativa [111, 112].

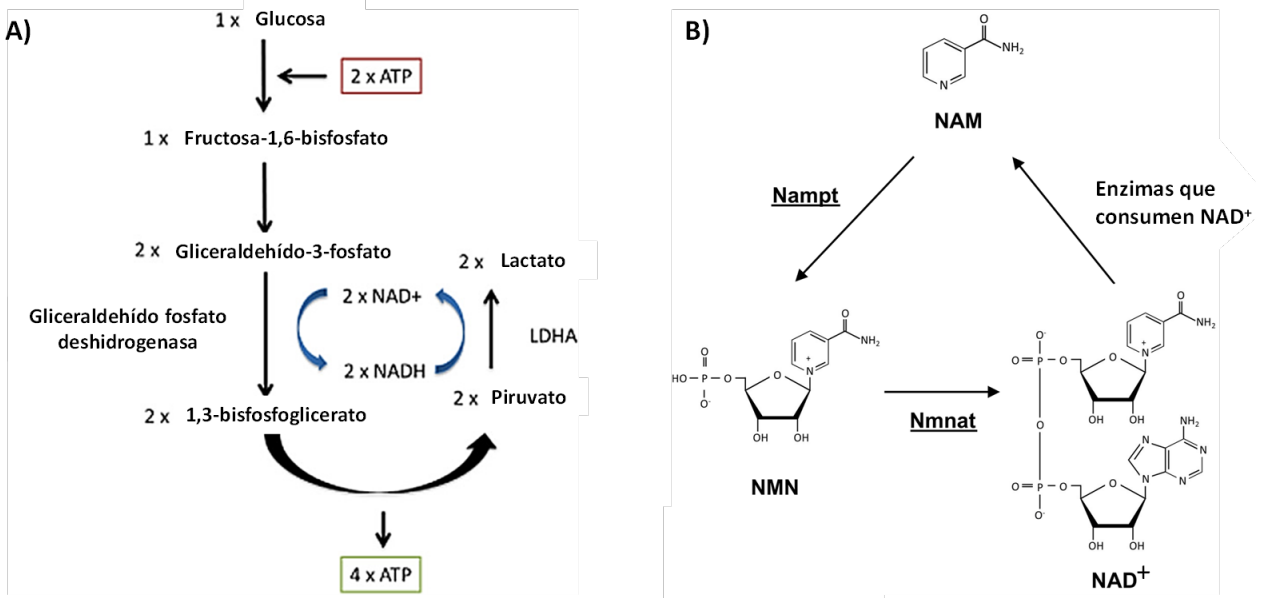


Figura 3.7: Regeneración de NAD^+ a partir de la producción de lactato y nicotinamida. A) Para mantener el flujo glucolítico se requiere regenerar NAD^+ a partir de la reducción del piruvato en lactato, y adicionalmente, B) el NAD^+ puede ser sintetizado por medio de la vía de rescate a partir de nicotinamida, la cual se transforma en nicotinamida mononucleótido (NMN) por la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), posteriormente NMN se conjuga con ATP y se convierte en NAD^+ por la NMN adenililtransferasa (NMNAT). Adaptado de [116, 118].

Para asistir la restauración del nivel de NAD^+ intracelular se puede utilizar nicotinamida (Nam) que es uno de sus precursores [112], el cual se cree ingresa a la célula a través de transportadores de solutos (SLC) [113]. Nam es aprovechado en la vía de rescate de NAD^+ , donde se transforma inicialmente en mononucleótido de nicotinamida (NMN) por la enzima nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) para finalmente convertirse en NAD^+ por enzimas mononucleótido adenililtransferasas [111] (ver Figura 3.7). Existen antecedentes donde la adición de nicotinamida al medio de cultivo permite el reequilibrio del ciclo redox NAD^+/NADH en células hBSC, lo que a su vez reduce la senescencia replicativa, y recupera el potencial de formación de colonias [112]. Por otro lado, hASC cultivadas *in vitro* parecen mantener el ciclo redox con una leve reducción de la relación NAD^+/NADH (no significativo), sin embargo, la enzima NAMPT muestra una fuerte regulación a la baja luego de varios pasajes [114]. Además, cultivos de hASC tratados con Nam muestran menores tiempos de duplicación y alcanzan densidades celulares mayores [115].

Tabla 3.3: Concentraciones de piruvato y nicotinamida estudiadas en cultivos de células madre (sin efectos citotóxicos declarados/observados)

Componente	Concentración (mM)	Sistema	Ref.
Piruvato	1	hASC	[35]
	0,5; 8; 16	hESC	[108]
Nicotinamida	5	hASC	[115]
	0,1; 0,5; 1; 5; 10	hESC	[117]
	1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15	hBSC y hASC	[119]

3.4. Metodología de superficie de respuesta

El Espacio de Diseño de un bioproceso comprende los niveles aceptables o un “rango de operación normal” de los Parámetros Críticos del Proceso para garantizar la calidad del producto [25]. Para definir y explorar el espacio de diseño se puede utilizar la Metodología de Superficie de Respuesta [25], una herramienta para el desarrollo de bioprocesos en base al *Quality-by-Design* [120].

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es una técnica estadística introducida por Box y Wilson que permite ajustar datos experimentales a un modelo, el cual ayuda a predecir el comportamiento de una respuesta de interés dentro del espacio experimental estudiado [121, 122]. La MSR ha sido ampliamente utilizada para la optimización de cultivos de células madre, determinando valores de condiciones/parámetros del cultivo [120, 123, 124, 125, 126], concentración de compuestos del medio de cultivo [124, 126, 127, 128], y composición de sustratos de matrices tridimensionales (*scaffolds*) [129].

3.4.1. Modelo de primer y segundo orden

Los modelos de superficie de respuesta son polinomios de 2 o más variables (factores) los cuales pueden ser de 1° o 2° orden [130]:

- **Modelo de primer orden:** permite caracterizar preliminarmente la superficie de respuesta y detectar la presencia de curvatura. El modelo de 1° orden tiene la forma de

un hiperplano, y el polinomio para k número de factores se muestra a continuación [130]:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \epsilon$$

- **Modelo de segundo orden:** permite caracterizar la superficie de respuesta cuando es más compleja que un hiperplano y se sabe que existe curvatura. El modelo de 2° orden permite determinar los valores óptimos de los factores, y el polinomio para k número de factores se muestra a continuación [130]:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \epsilon$$

El particular, los modelos deben representar en al menos un 70% (en términos de R^2) el comportamiento de la respuesta, de lo contrario no es recomendable utilizarlo para optimización dada su baja calidad predictiva [130].

3.5. Regímenes de operación de cultivo

Para mantener la operación del bioproceso dentro del espacio de diseño se requiere un estrategia de control [25]. Una alternativa para controlar el bioproceso es por medio de los modos de operación que comprenden distintas estrategias de alimentación [16, 85] (ver Figura 3.8):

- **Cultivo por lote (*batch*):** el medio de cultivo se proporciona sólo una vez cuando las células son sembradas, no existe recambio ni adición de medio de cultivo fresco posterior a la inoculación, por lo tanto, el volumen de trabajo permanece constante. En este tipo de cultivo las células metabolizan los nutrientes entregados al inicio del cultivo y crecen de forma proporcional al consumo de los mismos. Es el modo de operación más simple y posee el menor riesgo de contaminación pero no es eficiente para la expansión prolongada de células madre ni para obtener densidades celulares elevadas considerando que los nutrientes se agotan y las concentraciones de los mismos son limitados.
- **Cultivo por lotes repetitivos (*repeated batch*):** comienza con un modo de operación *batch* y luego continua con ciclos de alimentación repetitiva, donde se reemplaza sistemáticamente un volumen constante de medio de cultivo para restaurar los niveles de nutrientes y metabolitos, por lo tanto, el volumen de trabajo permanece constante excepto durante los reemplazos de medio. Lo anterior genera un patrón “zigzagueante” en el perfil de metabolitos, esto provoca que los nutrientes nunca se agoten completamente y los desechos no se acumulan hasta niveles inhibitorios, lo que permite alcanzar rendimientos celulares superiores al modo *batch*. Se utiliza típicamente para cultivos 2-D, y ha mostrado buenos resultados en cultivos 3-D.
- **Cultivo lote alimentado (*fed batch*):** existe una corriente de medio de cultivo concentrada en nutrientes (típicamente glucosa y aminoácidos) que se alimenta durante el cultivo, lo que provoca un aumento del volumen de trabajo. Esto permite subsanar la reducción de los nutrientes exhibida en los cultivos *batch* alcanzando mayores densidades celulares, sin embargo, existe una progresiva acumulación de metabolitos tóxicos.

- **Cultivo en perfusión (*continuous feeding*):** existe un reemplazo ininterrumpido de medio de cultivo proporcionado por un flujo constante de entrada y salida hacia y desde el cultivo (respectivamente), y el flujo de salida está acoplado a un sistema de retención de biomasa para evitar la pérdida de células en cultivos en suspensión. A diferencia de los cultivos *repeated batch*, el cultivo en perfusión permite condiciones más homogéneas sin mostrar patrones zigzagueantes en los parámetros metabólicos, y permite la obtención de mayores densidades celulares. De todas formas, se debe considerar la mayor complejidad operativa y los riesgos de contaminación asociados.

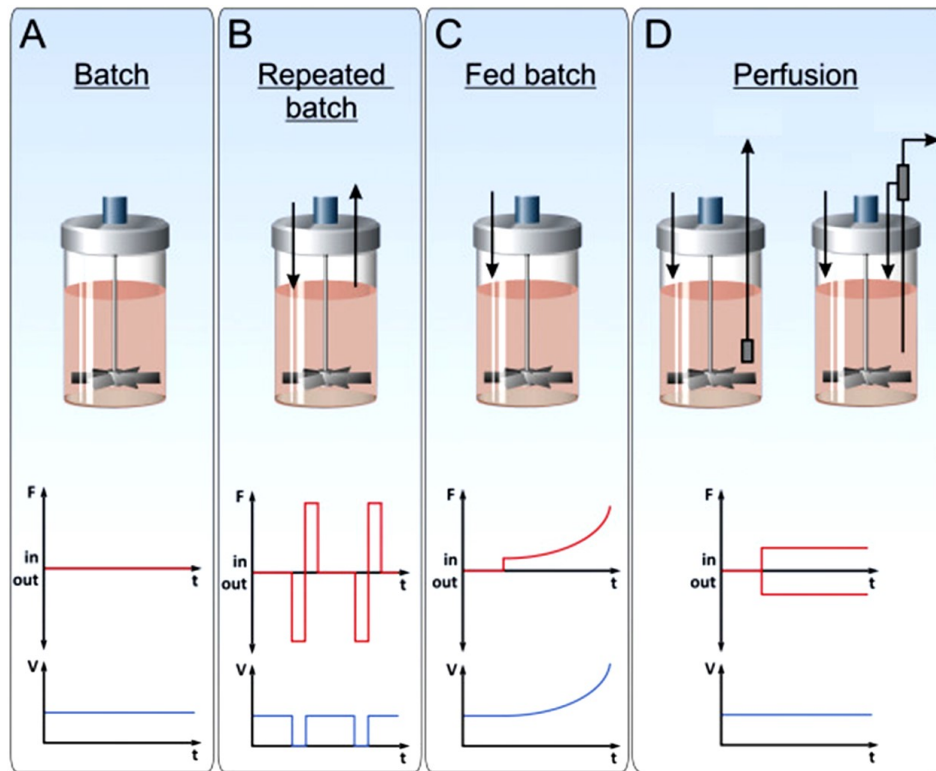


Figura 3.8: Modos de operación de cultivos de células madre. Se muestra el perfil de los flujos de entrada (*in*) y salida (*out*) de medio de cultivo, y el perfil del volumen de trabajo para cada modo de operación. Cultivo por A) lote (*batch*), B) lotes repetitivos (*repeated batch*), C) lote alimentado (*fed batch*), y D) perfusión con un sistema de retención de biomasa interna (izquierda) y externa (derecha). Adaptado de [16]

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1. Reactivos

- Piruvato de sodio (Gibco™ 11360070)
- Nicotinamida (Sigma™ N0636)
- α -MEM, con nucleósidos (Gibco™ 11900016)
- PenStrep (Penicilina-Estreptomicina) (Gibco™ 15140122)
- Suero fetal bovino (HyClone™ SV30160.03)
- Bicarbonato de sodio (Sigma™ S5761)
- Etanolamina (Sigma™ E0135)
- Selenito de sodio (Sigma™ S5261)
- Putrescina dihidrocloruro (Sigma™ P5780)
- N-Acetil-L-cisteína (Sigma™ A9165)
- *Kit* cuantificación ácido pirúvico (BioSystems© 12826)
- *Kit* cuantificación D-glucosa (BioSystems© 12800)
- *Kit* cuantificación ácido L-láctico (BioSystems© 12802)
- Tripsina (Gibco™ 15400054)
- DPBS sin calcio, sin magnesio (Gibco™ 21600010)
- Azul de tripán (Sigma™ T8154)
- *Kit* de diferenciación de adipogénesis (Gibco™ A1007001)
- *Kit* de diferenciación de condrogénesis (Gibco™ A1007101)
- *Kit* de diferenciación de osteogénesis (Gibco™ A1007201)
- Aceite rojo O (Thermo Scientific™ 189400250)
- Safranina O (Thermo Scientific™ B21674.09)
- Rojo de alizarina S (Thermo Scientific™ 400480250)
- Cytodex® 1 *microcarrier beads* (Cytiva)
- Cristal violeta (Sigma™ 42555)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma™ D2650)
- FITC Human IgG1 Isotype Control Recombinant Antibody (BioLegend® 403508)
- PE Human IgG1 Isotype Control Recombinant Antibody (BioLegend® 403504)
- FITC anti-human CD45 Antibody (BioLegend® 368508)

- PE anti-human CD34 Antibody (BioLegend® 343506)
- FITC anti-human CD90 Antibody (BioLegend® 328108)
- PE anti-human CD105 Antibody (BioLegend® 323206)
- FITC anti-human CD44 Antibody (BioLegend® 338804)
- PE anti-human CD73 Antibody (BioLegend® 344004)
- FITC anti-human CD19 Antibody (BioLegend® 363008)
- PE anti-human CD29 Antibody (BioLegend® 303004)
- FITC anti-human CD11b Antibody (BioLegend® 301330)
- PE anti-human HLA-DR Antibody (BioLegend® 307606)

4.2. Equipos

- Baño térmico (Labtech)
- Cámara de flujo laminar, nivel bioseguridad 2 (Nuairie NU-201330E)
- Incubadora (Nuairie® NU-5731E)
- Microscopio (Olympus CK2)
- pHmetro (HANNA HI2020-02)
- Centrífuga (Boeco C-28)
- Centrífuga para microtubos (Sprout®)
- Analizador automático en *Random Access* (BioSystems©)
- Agitador magnético (Thermo Scientific™ Biosystem 4)
- Controlador de agitador magnético (Cimarec™ Biosystem 40B)
- *Orbital shaker* (Thermo Scientific™ 4317)
- Tanque de nitrógeno líquido (Taylor Wharton XT20)
- Congelador -80°C (So-Low U85-13)
- Citómetro de flujo (BD FacsCanto™ A)

4.3. Material de laboratorio

- Placas de cultivo 60 mm
- *Spinner flask*, 125 mL con impulsor de paleta (Wheaton®)
- Reactivo siliconante para vidrio (Sigma-cote®)
- Tubos de centrifuga 15 y 50 mL
- Tubos *eppendorf* 1,5 y 2 mL
- Agua desionizada (milli-Q)
- Agua destilada
- Etanol 70 %
- Propipetas
- Pipetas serológicas
- Micropipetas
- Puntas p20, p200 y p1000
- Frascos 500 mL

- Vasos precipitados 100 mL, 250 mL, 1 L
- Matraces 200 mL
- Cámara de Neubauer
- Filtro de 0,22 μm
- Papel filtro grado 2
- Recipiente de congelación, Mr. Frosty (Thermo Scientific®)
- Placas de 24 pocillos
- T-*flask* 75, 175

4.4. Métodos

4.4.1. Preparación de medio de cultivo basal

Se utilizó medio de cultivo α -MEM antiOX (desarrollado en el estudio de Lorna León [68]), que comprende medio α -MEM (Gibco™) con antioxidantes. Se agregó 1 sobre de medio α -MEM en polvo en 1 L de agua milli-Q en un vaso precipitado, se homogenizó la mezcla con ayuda de un agitador magnético, se agregó bicarbonato de sodio, etanolamina, selenito de sodio, putrescina y N-Acetil-L-cisteína de acuerdo a la Tabla 4.1, y se homogenizó. Se ajustó el pH con ácido clorhídrico (HCl) y/o hidróxido de sodio (NaOH) hasta alcanzar pH 7,4. Posteriormente, la solución se pasó por un filtro de 0,22 μm para esterilizar el medio de cultivo, se agregó Penicilina/Estreptomina (PenStrep), y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Tabla 4.1: Componentes para 1 L de medio α -MEM antiOX

Componente	Cantidad
Bicarbonato de sodio	2,2 g
Etanolamina	0,1 mL
Selenito de sodio	1 μL
Putrescina	1 mg
N-acetil-L-cisteína	0,16 g

4.4.2. Banco de células

Se utilizaron hASC extraídas y aisladas de tejido graso abdominal de un único donante sometido a lipoaspiración bajo consentimiento informado. Estas células se mantuvieron criopreservadas en su pasaje 1 en crioviales a -196°C en un *Master Tank* de nitrógeno líquido para su uso a largo plazo.

Parte de los crioviales presentes en el *Master Tank* se descongelaron y sembraron en placas de cultivo con α -MEM antiOX y 10 % SFB a una densidad de 5.000 cel/cm², y se llevaron a incubar a 37°C, 5 % CO₂ y 70 % humedad. Luego de alcanzar una confluencia aproximada del 90 %, las placas se lavan con PBS, las células se despegaron con tripsina durante 7-15 min, se detuvo la tripsinización con medio de cultivo fresco y la mezcla se llevó a centrifugar durante 9 min a 1.200 rpm. El *pellet* se resuspendió en medio de cultivo fresco y se contó la cantidad de células con la técnica de exclusión por azul de tripán. Las células se suspendieron en una solución de SFB con 10 % DMSO hasta alcanzar una concentración de 1×10^6 cel/mL, la mezcla se repartió en crioviales a razón de 1 mL por criovial. Los crioviales con células en

pasaje 2 se introducen en un recipiente de congelación (*Mister Frosty*) con alcohol isopropílico y se llevó a -80°C . Posterior a 24 h o más, los crioviales se llevaron a -196°C en un *Working Tank* de nitrógeno líquido para su uso a corto plazo.

4.4.3. Expansión de células para experimentos en monocapa y suspensión

Para alcanzar el número de células necesario para los experimentos en monocapa (ver Sección 4.4.4) y suspensión (ver Sección 4.4.5) se expandieron las hASC inicialmente en placas de cultivo tipo T-*flask*.

Parte de los crioviales presentes en el *Working Tank* se descongelaron y sembraron en placas de cultivo con α -MEM antiOX y 10% SFB a una densidad de 5.000 cel/cm², y se llevaron a incubar a 37°C , 5% CO₂ y 70% humedad. Luego de alcanzar una confluencia aproximada del 90% se realizó un subcultivo lavando las placas con PBS, agregando tripsina para despegar las células durante 7-15 min, deteniendo la tripsina con medio de cultivo fresco, y llevando la mezcla a centrifugar durante 9 min a 1.200 rpm. El *pellet* se resuspendió en medio de cultivo fresco y se contó la cantidad de células con la técnica de exclusión por azul de tripán, y se sembraron en placas de cultivo con α -MEM antiOX (ver Tabla 4.1) y 10% SFB a una densidad de 5.000 cel/cm², y se llevaron a incubar a 37°C , 5% CO₂ y 70% humedad. En particular, la expansión se realizó en normoxia ($\sim 21\%$ O₂) y/o en hipoxia (5% O₂) según se requirió.

4.4.4. Cultivo en monocapa

Se sembraron placas de cultivo de 60 mm de diámetro a una densidad de 5.000 cel/cm², utilizando 3 mL de medio de cultivo “basal” α -MEM antiOX, suplementado con 5% SFB, piruvato y nicotinamida de acuerdo al diseño de experimento que se muestra en la Tabla 4.3. Todo el volumen de medio de cultivo se retiró y reemplazó periódicamente por medio fresco a partir del segundo día desde la siembra. En particular, los cultivos se realizaron en normoxia ($\sim 21\%$ O₂) y en hipoxia (5% O₂).

4.4.4.1. Recuento de células

Todos los días se realizó un conteo de células. Las placas de cultivo se lavaron 3 veces con PBS, luego de remover el PBS remanente se agregó 450-600 μL de tripsina y se dejó actuar durante 7-15 min. Para detener la tripsina se agregó 300-350 μL de SFB y la mezcla se pipeteó hasta que la totalidad de células quedaron suspendidas y desagregadas. Luego, la mezcla se traspasó a tubos *ependorf* y se homogenizó cuidadosamente por inversión. Se realizó el conteo de células vivas y muertas por la técnica de exclusión por azul de tripán bajo microscopía óptica.

4.4.5. Cultivo en suspensión

4.4.5.1. Preparación de *microcarriers*

Se utilizaron *microcarriers* Cytodex® 1 (ver Tabla 4.2). Los *microcarriers* se hidrataron en PBS dentro de un matraz a una concentración de 10 g/L manteniendo agitación constante

durante 3 h o más, y se llevaron a autoclavar. Posteriormente, el PBS se recambió por medio de cultivo (sin SFB), y la suspensión se concentró hasta obtener un *stock* de *microcarriers* a 20 g/L. Finalmente, 20 mL del *stock* de *microcarriers* se depositaron al interior de los *spinners*, se completó con medio de cultivo hasta alcanzar 40 mL, y se llevaron a incubar durante 3 h o más para ambientarlos antes de la siembra.

Tabla 4.2: Especificaciones *microcarriers* Cytodex® 1

Especificación	Valor
Densidad (g/L)	1,03
Área (cm ² /g peso seco)	4.400
Cantidad (MC/g peso seco)	4.300.000

4.4.5.2. Siembra y cultivo

Se utilizaron *spinners* (previamente siliconizados) con un volumen inicial de cultivo de 50 mL de medio α -MEM antiOX suplementado con 1 % SFB, piruvato y nicotinamida, con una concentración de 8 g/L de *microcarriers* y una densidad celular de 200.000 cel/mL (5.680 cel/cm²). La siembra se realizó durante 12 h (o más) con ciclos de 5 min de agitación a 35 rpm y 40 min sin agitación.

Transcurrido 1 día desde la siembra, se utilizó un 5 % SFB, agitación permanente a 30-35 rpm y se recambió la mitad del medio de cultivo 1 vez al día. El volumen de cultivo se incrementó progresivamente hasta alcanzar 100 mL finales.

4.4.5.3. Recuento de células

Todos los días se realizó un conteo de células. Se extrajo una muestra de 1 mL de cultivo, se centrifugó para decantar los *microcarriers* con hASC adheridas, y se retiró el sobrenadante con medio de cultivo y células no adheridas. El *pellet* de *microcarriers* con células adheridas se resuspendió en una solución de cristal violeta hasta alcanzar un volumen de 1 mL y se agitó durante 5 min. A continuación, se contaron los núcleos bajo microscopía óptica.

4.4.6. Análisis de crecimiento celular

4.4.6.1. *Fold change* del número de células

Los valores de recuento celular se graficaron en función del tiempo construyendo una curva de crecimiento. Esta curva se ajustó a un polinomio $x(t)$ que permitió estimar el número de células en el tiempo. El *fold change* $FC(t_1, t_2)$ entre los tiempos $t_1 < t_2$ viene dado por la expresión 4.1 (basado en los estudios de Zhang *et al.* [132] y Jossen *et al.* [133]). El *fold change* se estima en un periodo que comprende el comienzo de la fase exponencial (24 h) y el inicio de la fase estacionaria (108 h) del crecimiento para cultivos en monocapa, y para los cultivos en suspensión se calcula entre el tiempo inicial (0 h) y final del cultivo (240 h).

$$FC(t_1, t_2) = \frac{x(t_2)}{x(t_1)} \quad (4.1)$$

4.4.6.2. Tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación

La tasa específica de crecimiento celular μ puede estimarse de acuerdo a la expresión 4.2. Durante la fase exponencial μ toma un valor máximo $\mu_{m\acute{a}x}$, el cual se estimó mediante un ajuste exponencial $x^{exp}(t)$ de la curva de crecimiento. La forma del ajuste entre los tiempos $t_1 < t_2$ se muestra en la expresión 4.3 (basado en el estudio de Schop *et al.* [100]).

$$\mu(t_i) = \frac{1}{x(t_i)} \cdot \left. \frac{dx}{dt} \right|_{t_i} \quad (4.2)$$

$$\frac{x^{exp}(t_2)}{x^{exp}(t_1)} = e^{\mu_{m\acute{a}x} \cdot \Delta t} \quad (4.3)$$

Por otro lado, el tiempo de duplicación se calculó según la expresión 4.4 (basado en el estudio de Schop *et al.* [100]).

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (4.4)$$

4.4.7. Análisis metabólico

4.4.7.1. Evaluación de concentración y moles de metabolitos

Todos los días de cultivo se extrajeron muestras del medio de cultivo para medir concentración de glucosa, lactato, y piruvato. No se midió concentración de nicotinamida por no disponer de un *kit* de cuantificación para este compuesto. Las muestras se analizaron por espectrofotometría en el equipo *Analyzer Y15* (Biosystem™) bajo los ensayos de D-GLUCOSE/D-FRUCTOSE (hexokinase/phosphoglucose isomerase) para la glucosa (en g/L), L-LACTIC ACID (L-lactate dehydrogenase) para el lactato (en g/L) y PYRUVIC ACID (D-lactate dehydrogenase) para piruvato (en mg/L) ajustando el modo “Procedimiento Automatizado”. Si las muestras no se analizaron en el momento en las que se extrajeron, entonces se almacenaron a -4°C , luego al momento de descongelarlas se homogeneizaron por inversión.

Teniendo la concentración del metabolito en el medio, se realiza un cambio de unidades a mM y se estiman los mmoles a partir de las expresiones 4.5 y 4.6.

$$C_i(mM) = \frac{C_i(mg/L)}{PM_i(g/mol)} \quad (4.5)$$

$$m_i(mmoles) = C_i(mM) \cdot V_{cultivo}(L) \quad (4.6)$$

Donde C_i corresponde a la concentración del metabolito i , PM_i al peso molecular del metabolito i , m_i a los moles del metabolito i y $V_{cultivo}$ al volumen total del medio de cultivo en la placa o *spinner*, según corresponda.

4.4.7.2. Tasas específicas de consumo y producción de metabolitos

Se calcularon los mmoles consumidos de glucosa y piruvato, y mmoles producidos de lactato en base a los valores acumulados durante el tiempo de cultivo. Posteriormente, se realizó un ajuste polinomial a las curvas de mmoles acumulados obteniendo las funciones $G(t)$, $P(t)$,

y $L(t)$ para el consumo de mmoles de glucosa, piruvato, y producción de lactato en el tiempo, respectivamente.

Las tasas específicas de consumo de glucosa $qG(t_i)$, piruvato $qP(t_i)$, y producción de lactato $qL(t_i)$ en un tiempo t_i se estimaron de acuerdo a las expresiones 4.7, 4.8, y 4.9 (basado en el estudio de Petiot *et al.* [134]), respectivamente. En particular, las tasas específicas de consumo/producción de todos los experimentos se estimaron de acuerdo a un promedio simple entre el tiempo inicial y final de la fase exponencial.

$$qG(t_i) = \frac{1}{x(t_i)} \cdot \left. \frac{dG}{dt} \right|_{t_i} \quad (4.7)$$

$$qP(t_i) = \frac{1}{x(t_i)} \cdot \left. \frac{dP}{dt} \right|_{t_i} \quad (4.8)$$

$$qL(t_i) = \frac{1}{x(t_i)} \cdot \left. \frac{dL}{dt} \right|_{t_i} \quad (4.9)$$

4.4.7.3. Rendimientos de lactato a partir de fuentes de carbono

El rendimiento de lactato a partir de glucosa $\Delta L/\Delta G$ entre los tiempos $t_1 < t_2$ se calculó según la expresión 4.10 (basado en el estudio de Schop *et al.* [100]).

$$\Delta L/\Delta G = \frac{L(t_2) - L(t_1)}{G(t_2) - G(t_1)} \quad (4.10)$$

Por otro lado, se calcularon los mmoles de fuentes de carbono consumidos en base a la suma de los mmoles consumidos de glucosa y los mmoles consumidos de piruvato. Luego, se realizó un ajuste polinomial obteniendo la función $C(t)$ de consumo de mmoles de fuentes de carbono.

El rendimiento de lactato a partir de fuentes de carbono $\Delta L/\Delta C$ entre los tiempos $t_1 < t_2$ se calculó según la expresión 4.11. En particular, los rendimientos se estimaron en los tiempos de fase exponencial del crecimiento celular.

$$\Delta L/\Delta C = \frac{L(t_2) - L(t_1)}{C(t_2) - C(t_1)} \quad (4.11)$$

4.4.8. Metodología de superficie de respuesta

4.4.8.1. Diseño de experimentos

Se definieron 9 combinaciones de concentraciones (4 puntos axiales, 4 puntos factoriales y 1 punto central) de piruvato y nicotinamida entre 1 y 10 mM según un diseño de experimentos de composición central con distancia axial igual a 1,41. La Tabla 4.3 muestra las concentraciones de piruvato (Pyr) y nicotinamida (Nam) utilizadas, las cuales se visualizan en la Figura 4.1.

4.4.8.2. Modelo de superficie de respuesta

Se utilizó el *software* RStudio que posee el paquete **rsm** (*Response Surface Methodology*) [131] para ajustar los datos experimentales a un modelo de superficie de respuesta de segundo orden. El paquete además permite encontrar el punto estacionario que es candidato a concentraciones óptimas en el medio de cultivo.

El modelo de superficie de respuesta consideró 2 factores: concentración de piruvato C_{Pyr} y concentración de nicotinamida C_{Nam} (ver Tabla 4.4.6.1), mientras que el *fold change* FC (ver Sección 4.4.6.1) fue la respuesta que se optimizó. La forma del modelo viene dada por la expresión 4.12.

$$FC = \beta_0 + \beta_{Pyr} \cdot C_{Pyr} + \beta_{Nam} \cdot C_{Nam} + \beta_{Pyr^2} \cdot C_{Pyr}^2 + \beta_{Nam^2} \cdot C_{Nam}^2 + \beta_{Pyr \cdot Nam} \cdot C_{Pyr} \cdot C_{Nam} \quad (4.12)$$

Tabla 4.3: Diseño de experimentos

Exp.	Pyr (mM)	Nam (mM)
1	1	5,5
2	10	5,5
3	5,5	1
4	5,5	10
5	5,5	5,5
6	2,31	8,69
7	8,69	8,69
8	8,69	2,31
9	2,31	2,31

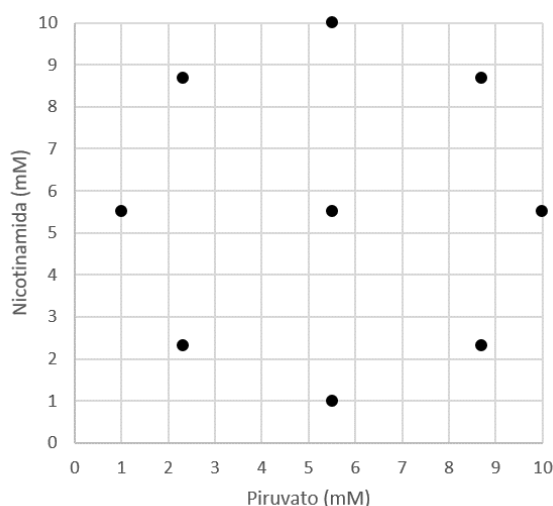


Figura 4.1: Representación gráfica del diseño de experimentos.

4.4.9. Caracterización de propiedades troncales

Se utilizaron cultivos en monocapa de hASC expandidas en las condiciones de medio de cultivo a evaluar durante 8 días realizando cambios de medio periódicamente.

4.4.9.1. Inmunotipificación de marcadores de superficie

Las células fueron cosechadas y lavadas 2 veces con PBS. Se distribuyeron 300 mil células en tubos de centrifuga en un volumen no superior a 250 μL y se incubaron con anticuerpos monoclonales, los cuales estaban conjugados con fluoróforos FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*) o PE (*PhycoErythrin*). Se estudió el panel de marcadores de superficie: **CD45** (FITC anti-human CD45 Antibody, BioLegend® 368508), **CD34** (PE anti-human CD34 Antibody, BioLegend® 343506), **CD90** (FITC anti-human CD90 Antibody, BioLegend® 328108), **CD105** (PE anti-human CD105 Antibody, BioLegend® 323206), **CD44** (FITC anti-human CD44 Antibody, BioLegend® 338804), **CD73** (PE anti-human CD73 Antibod, BioLegend® 344004),

CD19 (FITC anti-human CD19 Antibody, BioLegend® 363008), **CD29** (PE anti-human CD29 Antibody, BioLegend® 303004), **CD11b** (FITC anti-human CD11b Antibody, BioLegend® 301330) y **HLA-DR** (PE anti-human HLA-DR Antibody, BioLegend® 307606).

Para generar una línea base de las señales de fluorescencia se utilizó una muestra de hASC incubada con isotipos IgG1 (FITC Human IgG1 Isotype Control Recombinant Antibody, BioLegend® 403508, y PE Human IgG1 Isotype Control Recombinant Antibody, BioLegend® 403504) (ver Anexo B). Las muestras fueron analizadas con el citómetro de flujo BD FACS-Canto™ A de la Unidad de Citometría de la Red de Equipamiento Científico Avanzado (REDECA) de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4.4.9.2. Potencial de diferenciación

Las células fueron cosechadas y sembradas a densidades celulares específicas (ver Tabla 4.4) en placas de 24 pocillos con 500 μL de medio de cultivo fresco utilizado en la expansión. Desde el segundo día se reemplazó el medio de cultivo por medio de inducción y se realizaron cambios de medio programados 2 veces por semana hasta completar el tiempo de diferenciación indicado por el proveedor (ver Tabla 4.4). Para cada condición a evaluar, se utilizaron 3 pocillos control y 3 pocillos inducidos.

Al término de la diferenciación, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído 4% p/v, teñidas (ver Tabla 4.4), y visualizadas bajo microscopía óptica.

Tabla 4.4: Especificaciones para ensayos de diferenciación

Diferenciación	<i>Kit</i> utilizado	Densidad siembra	Tiempo	Tinción
Adipogénica	<i>Kit</i> de diferenciación para adipogénesis (Gibco™ A1007001)	10.000 cel/cm ²	8 días	Aceite rojo O
Condrogénica	<i>Kit</i> de diferenciación para condrogénesis (Gibco™ A1007101)	30.000 cel/cm ²	14 días	Safranina
Osteogénica	<i>Kit</i> de diferenciación para osteogénesis (Gibco™ A1007201)	15.000 cel/cm ²	21 días	Alizarina roja S

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1. Cultivo en monocapa

La Tabla 5.1 muestra los parámetros del crecimiento celular de hASC en condición normóxica e hipóxica. Es posible observar que el crecimiento se ve afectado por las concentraciones de piruvato y nicotinamida. En particular, la tasa específica de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) varía entre 0,482-0,636 día⁻¹ en normoxia y 0,468-0,655 día⁻¹ en hipoxia; el tiempo de duplicación (t_d) entre 26,2-34,5 h en normoxia y 25,4-35,5 h en hipoxia; y el *fold change* (FC) entre 3,84-4,96 en normoxia y 3,11-5,30 en hipoxia.

Tabla 5.1: Parámetros de crecimiento celular de hASC

Exp.	Pyr (mM)	Nam (mM)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (día ⁻¹)		t_d (h)		FC	
			Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia
1	1	5,5	0,636	0,487	26,2	34,1	4,60	3,40
2	10	5,5	0,588	0,497	28,3	33,5	4,51	3,11
3	5,5	1	0,602	0,586	27,6	28,4	4,34	4,08
4	5,5	10	0,559	0,528	29,7	31,5	4,34	3,80
5	5,5	5,5	0,502	0,468	33,2	35,5	4,96	4,65
6	2,31	8,69	0,482	0,552	34,5	30,1	4,09	4,11
7	8,69	8,69	0,535	0,509	31,1	32,7	4,90	3,63
8	8,69	2,31	0,509	0,542	32,7	30,7	3,84	3,60
9	2,31	2,31	0,523	0,655	31,8	25,4	4,05	5,30

En particular, el piruvato (derivado de la glucosa y proveniente del medio de cultivo) tiene efectos sobre la acetilación de histonas, proceso esencial para la entrada a la etapa S del ciclo celular [135, 136] y la proliferación. De hecho, se sabe que las células madre reducen la entrada del piruvato a la mitocondria para garantizar una disponibilidad de piruvato en el núcleo, el cual posteriormente, es convertido en acetyl-CoA por piruvato deshidrogenasas (PDH) translocadas desde la mitocondria al núcleo [135]. Adicionalmente, el piruvato puede ser convertido en citrato para posteriormente generar ácidos grasos [30] necesarios en la síntesis de membranas lipídicas. Por otro lado, la nicotinamida es el mayor sustrato para la biosíntesis de NAD⁺ en células mamíferas [137], el cual es altamente consumido por las 7 enzimas sirtuinas (SIRT 1-7) de células mamíferas, las que están implicadas en procesos de mitofagia, autofagia, y reparación del ADN [111]. Se sabe que la SIRT 1, una desacetilasa dependiente de NAD⁺, induce la expresión y la actividad de la telomerasa, lo que permitiría aumentar la longitud los telómeros del ADN en cultivos extensos de MSC (pasaje 8) [138],

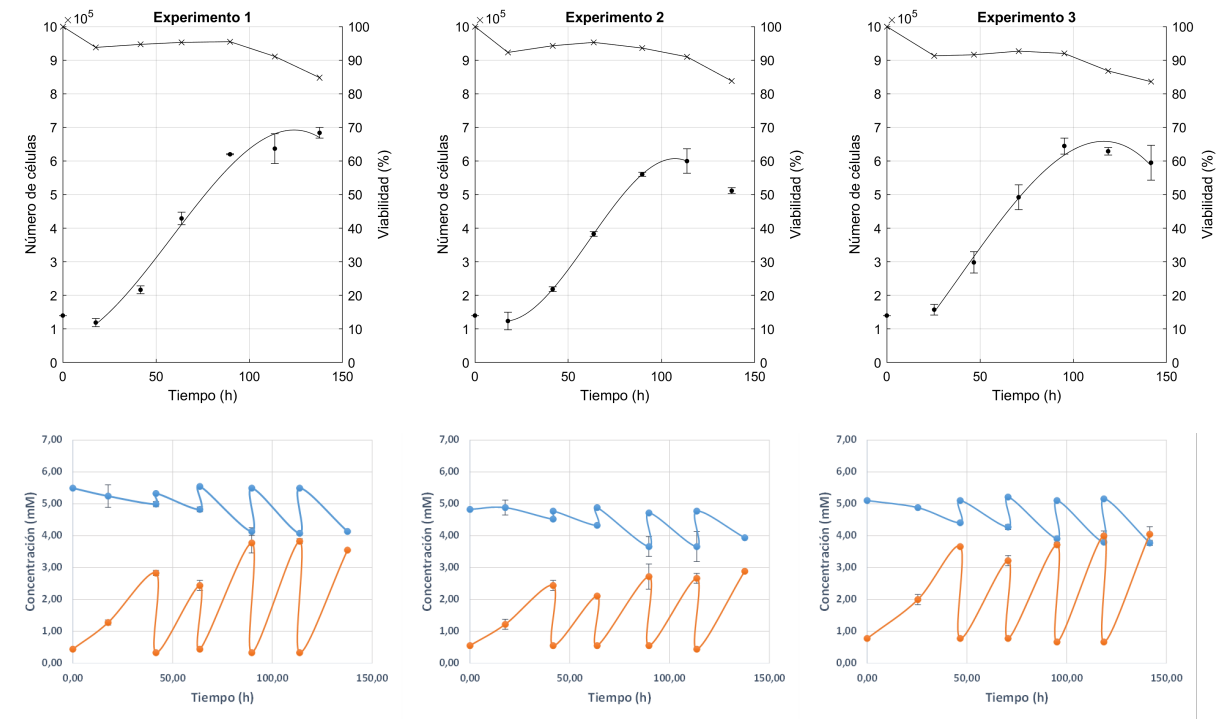
retrasando la senescencia replicativa y favoreciendo la proliferación. Además, se ha reportado que la nicotinamida es un inhibidor de la proteína ROCK [117].

Lo anterior podría explicar los efectos del piruvato y la nicotinamida sobre el crecimiento de hASC. Sin embargo, un aumento progresivo de la concentración de piruvato y/o nicotinamida en el medio de cultivo no provoca necesariamente un aumento progresivo en la cinética de crecimiento. Por ejemplo, hASC cultivadas con 1 mM de piruvato (experimento 1) reportan un *fold change* de 4,6 en normoxia y 3,4 en hipoxia, pero al aumentar la concentración a 10 mM de piruvato (experimento 2) se reporta un *fold change* menor de 4,51 en normoxia y 3,11 en hipoxia (algo similar ocurre con la nicotinamida, por ejemplo, al comparar los experimentos 3 y 4). Lo anterior puede deberse a los efectos del incremento de la osmolaridad [139]. Se ha reportado que hASC cultivadas *in vitro* en monocapa sometidas a osmolaridades superiores a los 300 mOsm/L muestran una disminución significativa en los tiempos de duplicación [139] producto del estrés osmótico.

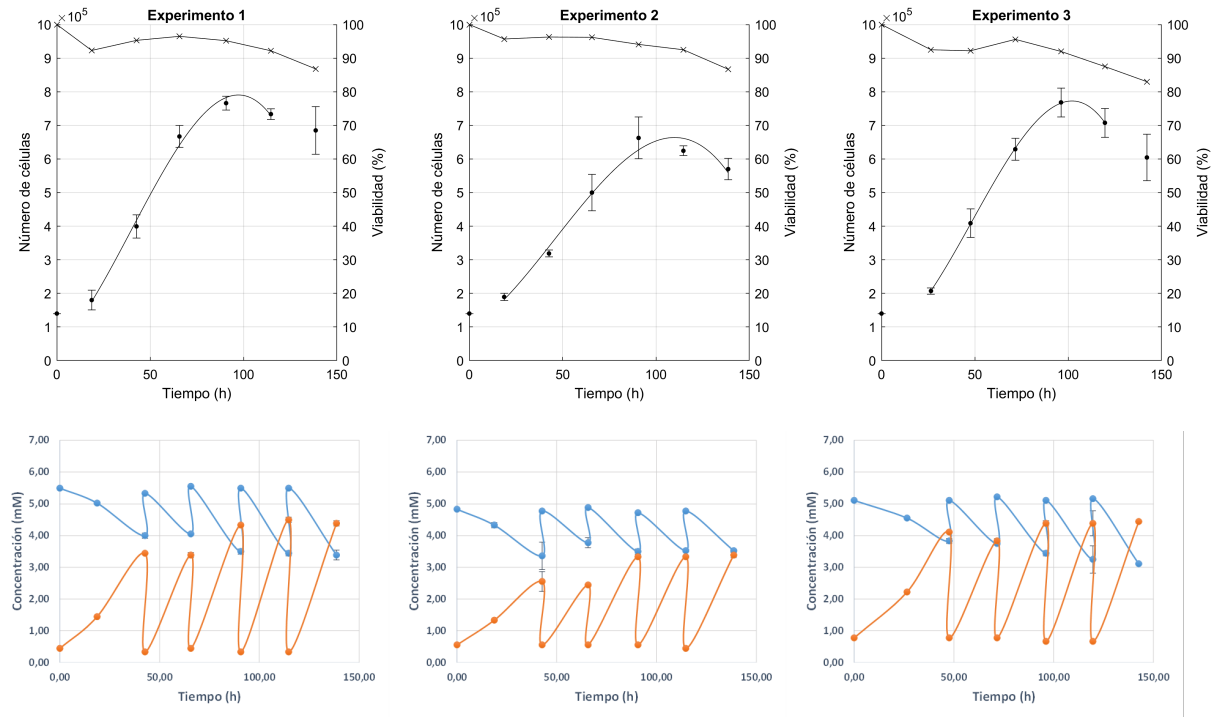
De todas formas, se observa que en algunos casos aunque la contribución conjunta del piruvato y la nicotinamida a la osmolaridad es menor, se reporta un *fold change* menor en comparación a otros experimentos donde la contribución de la osmolaridad es mayor. A modo de ejemplo, en el experimento 1 bajo normoxia, la contribución a la osmolaridad considerando piruvato y nicotinamida es de 6,5 mOsm/L y el *fold change* es de 4,60, mientras que en el experimento 7 la contribución a la osmolaridad es de 17,38 mOsm/L y el *fold change* asciende a 4,90, algo similar ocurre en hipoxia. Por lo anterior, debe existir un fenómeno adicional al estrés osmótico que afecte la proliferación de hASC. En particular, se sabe que existe una conexión entre los estados redox (en términos de NAD^+/NADH) y la senescencia replicativa en algunos tipos de células madre mamíferas [111, 112, 140, 141, 142]. Cuando las hMSC son cultivadas *in vitro* existe una acumulación de daño en el ADN, lo que activa enzimas PARP (*Poly-ADP-Ribose Polymerase*), esto reduce el NAD^+ intracelular, lo que provoca un desbalance de NAD^+/NADH junto con la inactivación de las sirtuinas regulando a la baja la biogénesis mitocondrial, la protección antioxidante, entre otras vías [142]. Se sabe que tanto el piruvato como la nicotinamida pueden desplazar la relación NAD^+/NADH [105, 112, 143].

En particular, la nicotinamida al ser un precursor de NAD^+ elevaría la relación NAD^+/NADH , por otro lado, el piruvato al convertirse en lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) generaría NAD^+ y elevaría la relación NAD^+/NADH , sin embargo, si el piruvato se convierte en acetil-CoA por acción de la piruvato deshidrogenasa (PDH) consumiría NAD^+ [144] y disminuiría la relación NAD^+/NADH . Adicionalmente, si se favorece la entrada del piruvato al ciclo de TCA, entonces el NAD^+ sería consumido por las enzimas isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa [142, 144] disminuyendo la relación NAD^+/NADH , pero si el piruvato favorece OxPhos (como ha reportado Song *et al.* [108]) entonces se regeneraría el NAD^+ por la cadena transportadora de electrones [116] elevando la relación NAD^+/NADH . Por lo tanto, dependiendo de los efectos en el metabolismo que tenga el piruvato y la nicotinamida, pueden existir combinaciones de concentraciones de ambos componentes que sean más favorables que otras para el estado redox y, por consiguiente, para la proliferación de las hASC.

Las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 muestran las curvas de crecimiento de hASC y la evolución de la concentración de glucosa y lactato en el medio de cultivo en los 9 experimentos tanto en hipoxia como en normoxia.

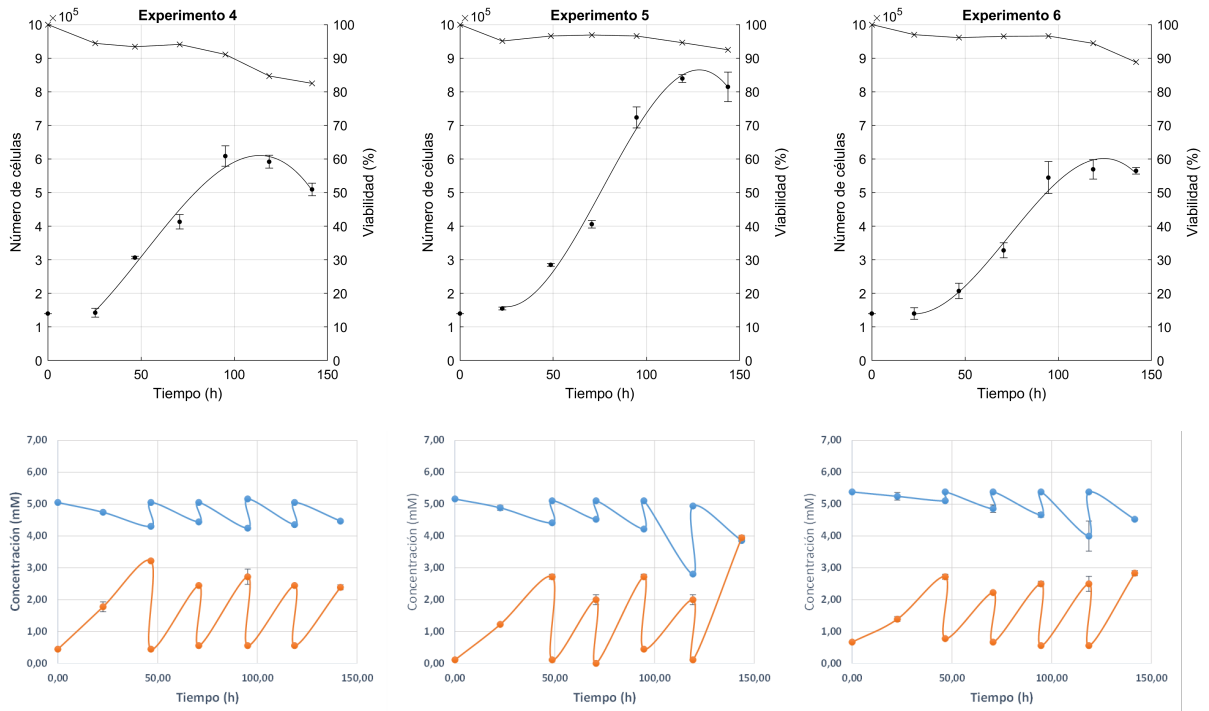


(a) **Normoxia.** Arriba curvas de crecimiento, abajo concentración de metabolitos.

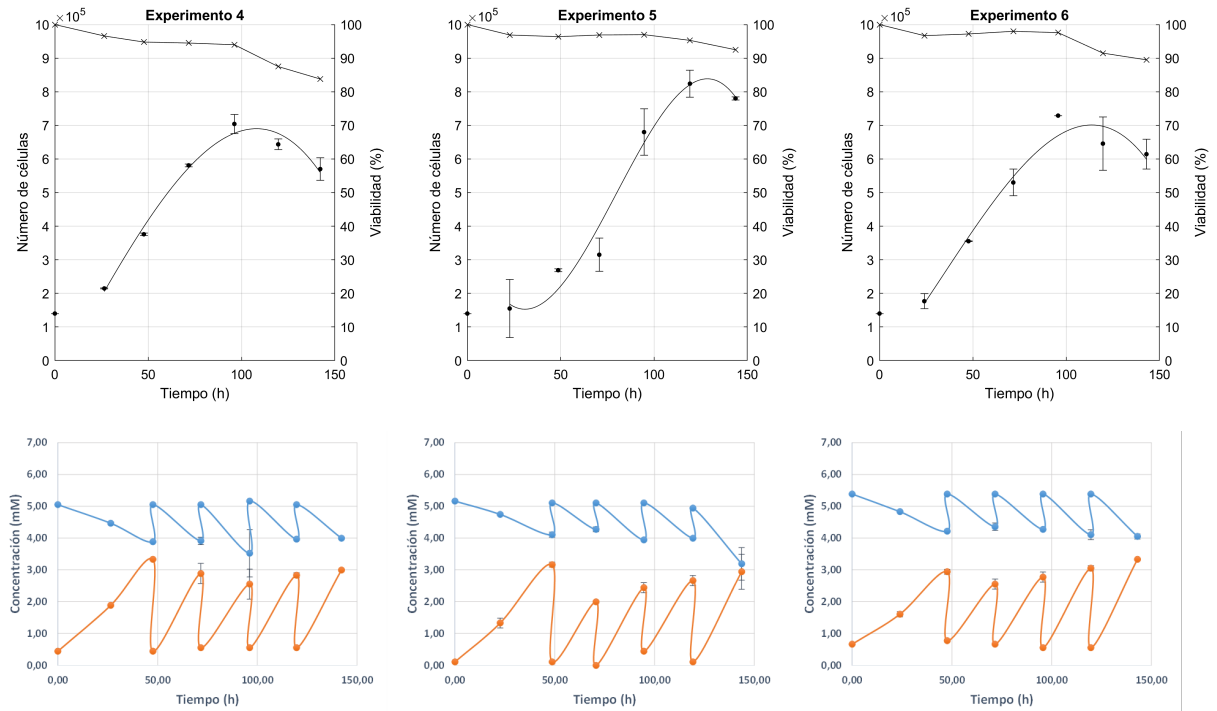


(b) **Hipoxia.** Arriba curvas de crecimiento, abajo concentración de metabolitos.

Figura 5.1: Experimentos 1 (1 mM Pyr y 5,5 mM Nam), 2 (10 mM Pyr y 5,5 mM Nam) y 3 (5,5 mM Pyr y 1 mM Nam). ●: número de células, - × -: viabilidad, - ● -: concentración de glucosa, y - ○ -: concentración de lactato (las barras de error corresponden a desviación estándar para n = 2 cultivos).

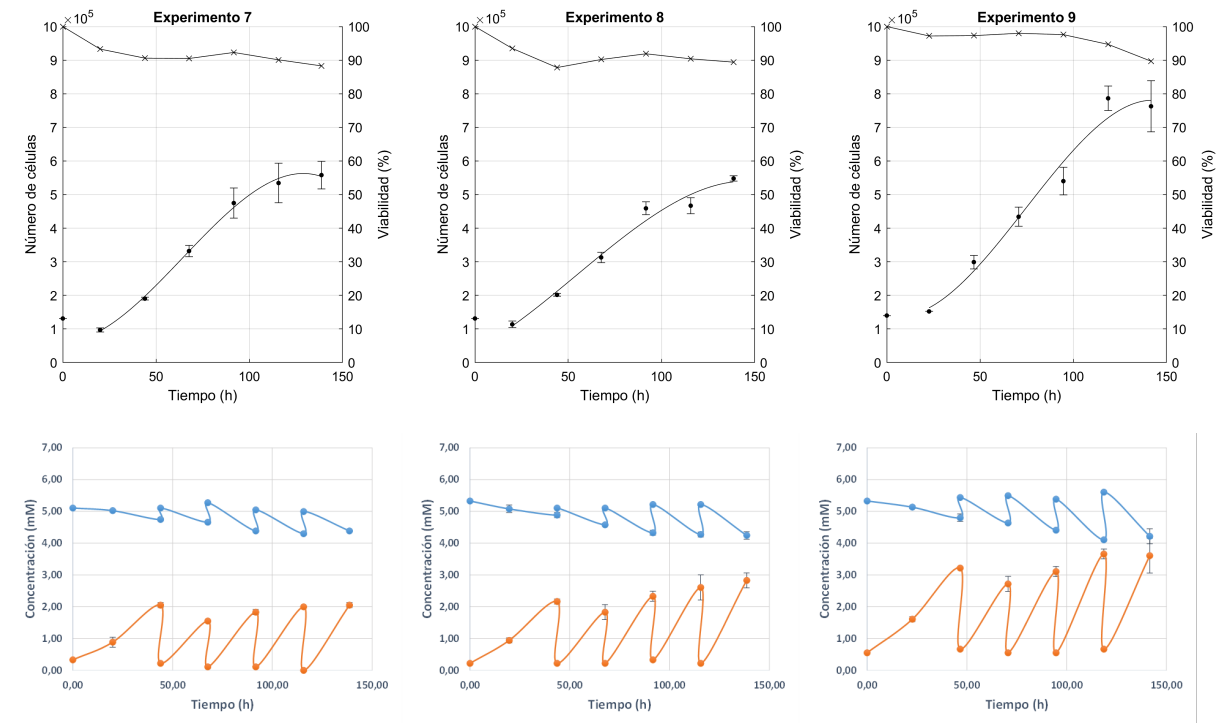


(a) **Normoxia.** Arriba curvas de crecimiento, abajo concentración de metabolitos.

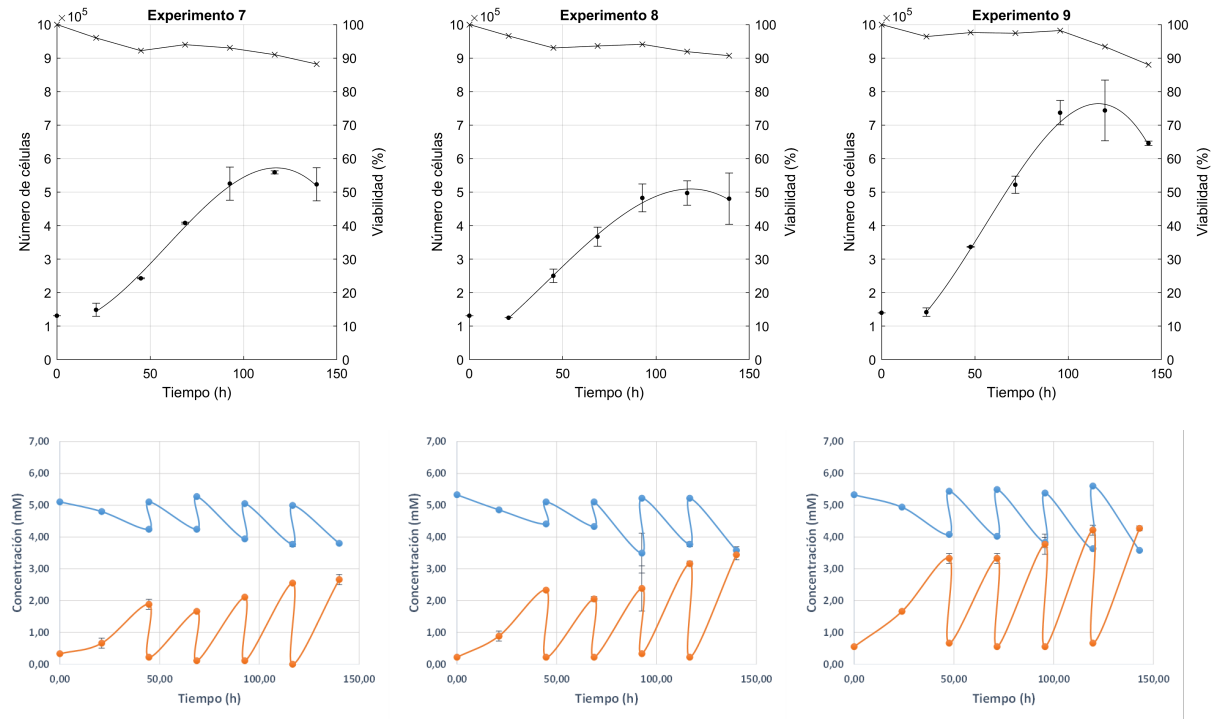


(b) **Hipoxia.** Arriba curvas de crecimiento, abajo concentración de metabolitos.

Figura 5.2: Experimentos 4 (5,5 mM Pyr y 10 mM Nam), 5 (5,5 mM Pyr y 5,5 mM Nam) y 6 (2,31 mM Pyr y 8,69 mM Nam). ●: número de células, - × -: viabilidad, - ● -: concentración de glucosa, y - ● -: concentración de lactato (las barras de error corresponden a desviación estándar para n = 2 cultivos).



(a) **Normoxia.** Arriba curvas de crecimiento, abajo concentración de metabolitos.



(b) **Hipoxia.** Arriba curvas de crecimiento, abajo concentración de metabolitos.

Figura 5.3: Experimentos 7 (8,69 mM Pyr y 8,69 mM Nam), 8 (8,69 mM Pyr y 2,31 mM Nam) y 9 (2,31 mM Pyr y 2,31 mM Nam). ●: número de células, - × -: viabilidad, - ● -: concentración de glucosa, y - ● -: concentración de lactato (las barras de error corresponden a desviación estándar para $n = 2$ cultivos).

Respecto al perfil de crecimiento, es posible identificar para todos los experimentos las 5 fases características para células mamíferas: fase *lag*, donde hay nula duplicación celular; fase exponencial temprana, donde comienza la duplicación celular y aumenta su tasa; fase exponencial, donde la tasa de duplicación es máxima; fase estacionaria temprana, donde la tasa de proliferación comienza a disminuir; y fase estacionaria, donde la duplicación celular cesa y el número de células puede comenzar a disminuir [147]. Por otro lado, el perfil de metabolitos posee una forma oscilatoria a causa de los cambios de medio de cultivo realizados periódicamente. Al agregar medio de cultivo fresco la concentración de glucosa aumenta a 5,5 mM (aprox.) que es la composición del medio α -MEM (ver Anexo A), mientras que la concentración de lactato disminuye. De todas formas, considerando que el medio α -MEM no posee lactato en su composición, se esperaría que al recambiar el medio de cultivo este metabolito alcanzara una concentración de 0 mM, lo cual no ocurre probablemente porque el suero fetal bovino (SFB) si posee lactato en niveles no despreciables [148], por lo tanto, aunque se utilice bajo nivel de SFB (5%), el lactato sigue siendo detectado.

En particular, observando las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 es posible notar que siempre existe disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo cuyo acceso no debería verse limitado considerando que las células viables siempre quedan expuestas en la superficie del cultivo 2D [149], y la concentración de lactato no supera concentraciones inhibitorias (sobre 35,4 mM [100]), por lo tanto, la desaceleración del crecimiento puede estar asociado a competencia por el espacio [150] y estrés oxidativo. En particular, la inhibición por contacto de la proliferación ocurre cuando se alcanza una gran densidad celular en el cultivo, las células entran en contacto formando uniones entre cadherinas, y se desencadena una cascada de señalización que detiene el crecimiento [151]. Esta vía de señalización garantiza que no exista una proliferación descontrolada de células en tejidos *in vivo*, sin embargo, se encuentra altamente regulada por factores de crecimiento [151], y el metabolismo energético [152]. Lo anterior podría explicar por qué se alcanzan distintas cantidades máximas de hASC para cada experimento, considerando que las señales metabólicas también pueden controlar la decisión celular de proliferar o detener el crecimiento en un cultivo confluyente.

La Tabla 5.2 muestra los parámetros del metabolismo celular en normoxia e hipoxia. Es posible notar que las concentraciones de piruvato y nicotinamida afectan los estados metabólicos de hASC. En particular, la tasa específica de consumo de glucosa (qG) varía entre 0,331-0,555 pmol·h⁻¹·cel⁻¹ para normoxia y entre 0,373-0,545 pmol·h⁻¹·cel⁻¹ para hipoxia; la tasa específica de producción de lactato (qL) varía entre 0,591-0,946 pmol·h⁻¹·cel⁻¹ para normoxia y entre 0,573-0,919 pmol·h⁻¹·cel⁻¹ para hipoxia; y el rendimiento de lactato a partir de glucosa ($\Delta L/\Delta G$) varía entre 1,74-2,74 para normoxia y entre 1,48-2,27 para hipoxia.

En particular, el valor máximo teórico de $\Delta L/\Delta G$ que se esperaría obtener es 2 (mol·mol⁻¹) [188], considerando que a partir de 1 molécula de glucosa, utilizada completamente en la fermentación láctica, se pueden obtener hasta 2 lactatos. Sin embargo, en algunos experimentos $\Delta L/\Delta G$ supera el máximo teórico, lo cual puede deberse a que existen otras fuentes de carbono que contribuyen a la producción de lactato además de la glucosa, como la glutamina [188] o el piruvato. Por el contrario, $\Delta L/\Delta G$ menores a 2 indican un aprovechamiento eficiente de la glucosa en la producción de energía por medio de la fosforilación oxidativa (OxPhos) [100, 154] y en la generación de bloques de construcción en rutas de biosíntesis.

En particular, se sabe que las bajas tensiones de oxígeno favorecen la expresión de la LDH y el transportador de monocarboxilato 4 (MCT4) lo que aumenta la producción de lactato y su liberación al medio extracelular [33, 155], sin embargo, de forma sorpresiva al observar la Tabla 5.2 es posible notar que en todos los experimentos se reporta un $\Delta L/\Delta G$ menor para la condición de hipoxia, es decir, la glucosa se metaboliza en lactato a una menor tasa. De todas formas, como se mencionó anteriormente en estos experimentos no se monitorizó el posible consumo de piruvato, lo que podría contribuir a la producción de lactato teniendo impacto sobre el $\Delta L/\Delta G$, de hecho de acuerdo al estudio de Mischen *et al.*, el consumo de piruvato es significativamente mayor en cultivos de hASC bajo normoxia en comparación a hipoxia (para bajas concentraciones de glucosa) [98]. Por lo anterior, sería conveniente evaluar el rendimiento de lactato a partir de fuentes de carbono $\Delta L/\Delta G$ propuesto en este estudio (ver Materiales y Métodos, Sección 4.4.7.3).

Tabla 5.2: Parámetros de metabolismo celular de hASC

Exp.	Pyr (mM)	Nam (mM)	qG (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)		qL (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)		$\Delta L/\Delta G$	
			Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia
1	1	5,5	0,555	0,545	0,946	0,859	2,66	2,03
2	10	5,5	0,430	0,457	0,695	0,625	1,99	1,52
3	5,5	1	0,347	0,390	0,894	0,839	2,74	2,26
4	5,5	10	0,373	0,373	0,883	0,704	2,74	1,94
5	5,5	5,5	0,386	0,418	0,693	0,741	1,93	1,68
6	2,31	8,69	0,331	0,401	0,591	0,606	1,82	1,60
7	8,69	8,69	0,523	0,463	0,746	0,573	1,74	1,48
8	8,69	2,31	0,492	0,521	0,852	0,839	2,14	2,05
9	2,31	2,31	0,408	0,522	0,732	0,919	2,02	1,82

Para evaluar cómo afecta el piruvato y la nicotinamida los estados metabólicos de hASC se comparan algunas tasas de consumo/producción de glucosa y lactato a distintos niveles de enriquecimiento del medio de cultivo.

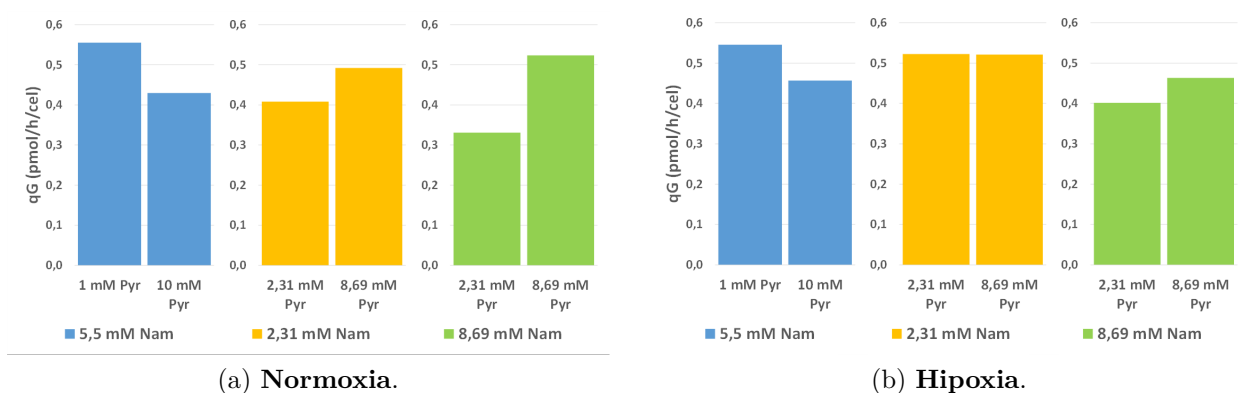


Figura 5.4: Consumo específico de glucosa a distintas concentraciones de piruvato. Se comparan los experimentos 1 y 2 (barras azules), 9 y 8 (barras amarillas), 6 y 7 (barras verdes).

La Figura 5.4 muestra la variación de qG frente a distintas concentraciones de piruvato en cultivos bajo normoxia e hipoxia. En particular, la glucosa es la principal fuente de energía

y un nutriente limitante para MSC, el cual es rápidamente consumido producto del metabolismo glucolítico de células madre [156, 157]. Se ha reportado incluso que la depleción de otras fuentes de carbono en el medio de cultivo como aminoácidos (incluida la glutamina) y piruvato parece no ser significativamente crítico comparado a la glucosa en algunos tipos de MSC [156]. En particular, al observar la Figura 5.4 es posible notar que aún cuando las hASC tienen más disponibilidad de otra fuente de carbono en el medio de cultivo, específicamente piruvato, sigue existiendo un consumo significativo de glucosa, de hecho tanto en normoxia como en hipoxia hay casos en los cuales el consumo específico de glucosa aumenta con el incremento en la concentración de piruvato. Lo anterior permite suponer que el piruvato no sustituye a la glucosa como principal fuente de carbono y energía, sino que ambos contribuirían conjuntamente al metabolismo de hASC.

La Figura 5.5 muestra la variación de q_L frente a distintas concentraciones de nicotinamida bajo normoxia e hipoxia. En particular, el lactato es el principal desecho metabólico de células madre y es producido a partir del piruvato por la lactato deshidrogenasa (LDH) para regenerar NAD^+ [30]. Al observar la Figura 5.5 es posible notar que las hASC que crecen en medios de cultivo con mayores concentraciones de nicotinamida exhiben tasas específicas de producción de lactato menores tanto en normoxia como en hipoxia. Lo anterior puede ocurrir porque la nicotinamida ingresa a la célula y es transformada en NAD^+ aumentando la concentración de esta coenzima en el medio intracelular, lo que provocaría que la reacción reversible de la LDH se desplace hacia la derecha. Talaiezadeh *et al.* ha reportado que, en células con metabolismo altamente glicolítico, la LDH posee menor afinidad por el lactato y NAD^+ , sin embargo, la constante de Michaelis-Menten K_m de la reacción reversa de LDH para NAD^+ es de 0,99 mM [145], así cambios leves en la concentración NAD^+ tendrían un alto impacto en la velocidad de reacción reversa. O por otro lado, puede ocurrir que se favorezca la reacción de la piruvato deshidrogenasa (PDH) generando acetyl-CoA a partir del piruvato producto de la inhibición de las piruvato deshidrogenasa quinasas (PDK) por regulación alostérica con el NAD^+ [46, 47]. En particular, Lees *et al.* observó que hESC sometidas a un medio de cultivo suplementado con NAD^+ disminuían su producción de lactato en un $\sim 40\%$ por la menor necesidad de reciclar NAD^+ por medio de la LDH [146], lo que podría ocurrir también con precursores de NAD^+ como la nicotinamida.

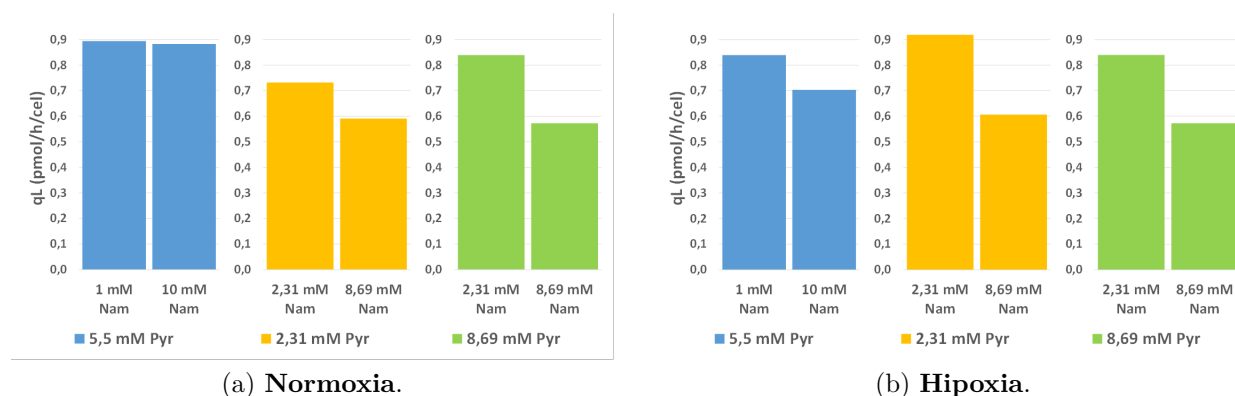


Figura 5.5: Producción específica de lactato a distintas concentraciones de nicotinamida. Se comparan los experimentos 3 y 4 (barras azules), 9 y 6 (barras amarillas), 8 y 7 (barras verdes).

La Figura 5.6 muestra la variación de q_L frente a distintas concentraciones de piruvato bajo

normoxia e hipoxia. En particular, se sabe que en algunos tipos de células madre el piruvato es metabolizado principalmente en lactato por la LDH [108], por lo tanto, se esperaría que al tener mayor disponibilidad de piruvato en el medio de cultivo qL aumente. Sin embargo, al observar la Figura 5.6, se evidencian casos en los cuales al aumentar la concentración de piruvato (y manteniendo la concentración de nicotinamida constante) qL disminuye. Esto puede ocurrir porque el consumo específico de piruvato no es significativo y/o el piruvato se aprovecha en vías metabólicas adicionales a la generación de lactato. En particular, se ha reportado que en algunos tipos de células madre sometidas a piruvato exógeno aumenta la expresión de enzimas relacionadas al metabolismo oxidativo como la PDH [108, 109], lo que puede provocar el desvío del piruvato, por ejemplo, al ciclo del TCA. Adicionalmente, las PDK pueden ser inhibidas alostéricamente por los niveles de piruvato [47], lo que favorecería la activación de las PDH y el aprovechamiento del piruvato en el ciclo de TCA.

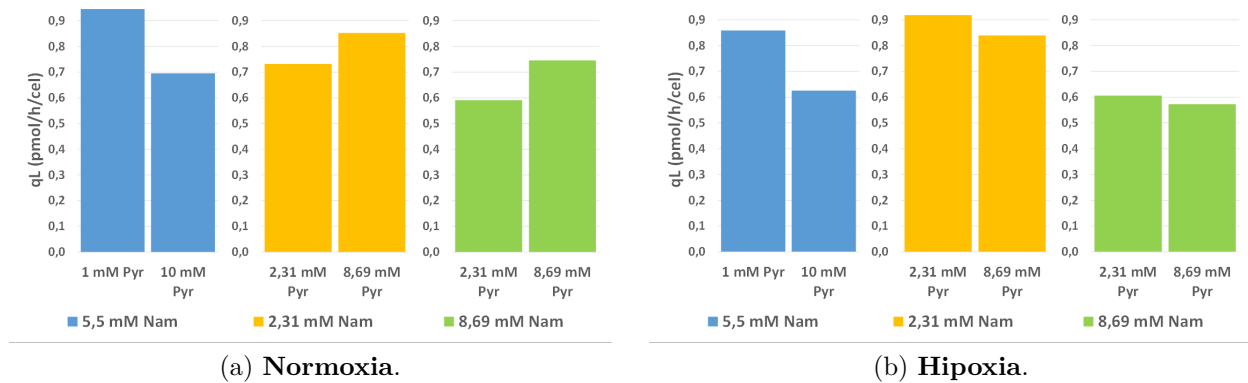


Figura 5.6: Producción específica de lactato a distintas concentraciones de piruvato. Se comparan los experimentos 1 y 2 (barras azules), 9 y 8 (barras amarillas), 6 y 7 (barras verdes).

Por otro lado, al observar la Tabla 5.2, es posible notar que en 7 de los 9 experimentos qG es mayor (o igual) para hASC cultivadas en condición hipóxica. Se ha reportado que hASC sometidas a hipoxia exhiben un mayor consumo de glucosa por una sobreexpresión de los glucotransportadores 1 y 3 (GLUT1 y GLUT3) favorecido por la acción del Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1) [158], esto da cuenta que el metabolismo de hASC está altamente regulado por la tensión de oxígeno.

5.1.1. Concentraciones óptimas de nicotinamida y piruvato

Al ajustar los datos experimentales de *fold change* a un Modelo de Superficie de Respuesta de segundo orden se obtienen las expresiones 5.1 y 5.2 (los coeficientes mostrados están aproximados), para normoxia (R^2 igual a 0,73) e hipoxia (R^2 igual a 0,7), respectivamente. Los puntos estacionarios para normoxia se encuentran en las concentraciones 6,29 mM de piruvato y 6,37 mM de nicotinamida, mientras que en hipoxia se encuentran en 3,82 mM de piruvato y 2,8 mM de nicotinamida. En ambos casos, los puntos corresponden a máximos, por lo tanto, se consideran concentraciones óptimas, y por simplicidad el medio de cultivo con estas concentraciones será nombrado como medio de cultivo α -MEM antiOX enriquecido.

$$FC_N = 3,52 + 0,16 \cdot C_{Pyr} + 0,3 \cdot C_{Nam} - 0,02 \cdot C_{Pyr}^2 - 0,03 \cdot C_{Nam}^2 + 0,02 \cdot C_{Pyr} \cdot C_{Nam} \quad (5.1)$$

$$FC_H = 4,17 + 0,33 \cdot C_{Pyr} + 6 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Nam} - 0,05 \cdot C_{Pyr}^2 - 0,02 \cdot C_{Nam}^2 + 0,03 \cdot C_{Pyr} \cdot C_{Nam} \quad (5.2)$$

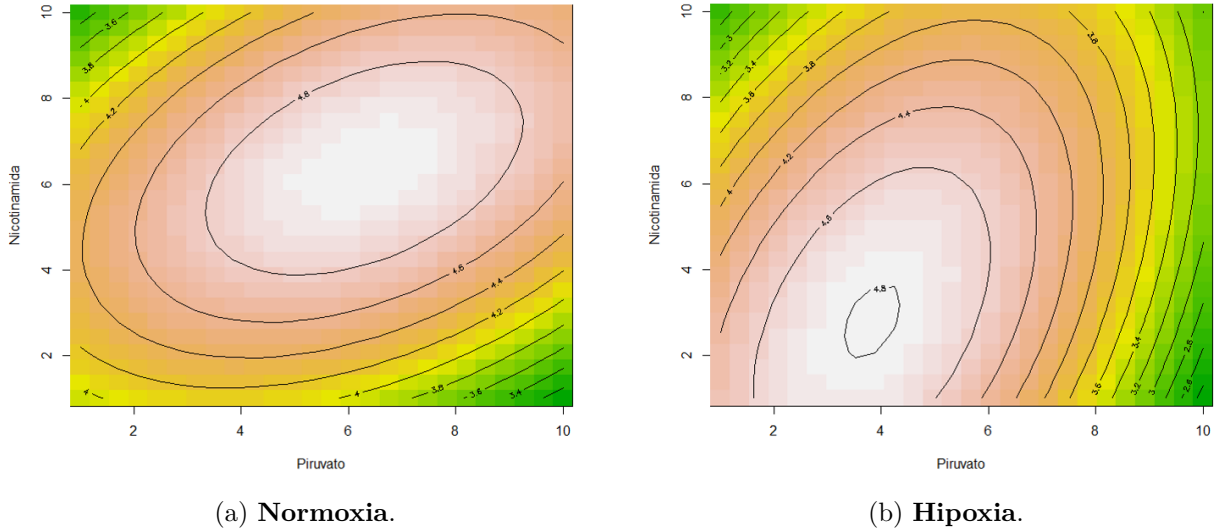


Figura 5.7: Gráfico de contornos para la respuesta *fold change* en función de la concentración de piruvato y nicotinamida.

Al observar la representación gráfica de las superficies de respuesta en la Figura 5.7, es posible notar que en normoxia se predice un *fold change* máximo cuando el medio de cultivo se ajusta a una proporción de piruvato y nicotinamida $C_{Pyr} : C_{Nam}$ menor a 1, no así en hipoxia donde se predice una respuesta máxima a una proporción $C_{Pyr} : C_{Nam}$ mayor a 1. Lo anterior puede deberse a que en normoxia las PDK se expresan en menor medida que en hipoxia (considerando que el HIF-1 está predominantemente inactivo), lo que permitiría tener PDH activas favoreciendo la conversión del piruvato en acetyl-CoA ya sea para el ciclo de TCA o para la acetilación de histonas, pero una mayor transformación del piruvato en acetyl-CoA y, por consiguiente, una menor producción de lactato significaría una menor tasa de regeneración de NAD^+ . Por lo anterior, se requeriría tener mayor disponibilidad de un precursor de NAD^+ , en este caso nicotinamida, que de piruvato en condición normóxica. Lo contrario ocurriría en hipoxia, donde teóricamente se aprovecharía más el piruvato para la producción de lactato generando NAD^+ , pero se necesitaría piruvato adicional para suplir el ciclo de TCA y la acetilación de histonas. De todas formas, con los datos recopilados en esta tesis no es posible corroborar (ni descartar) esta idea.

La Tabla 5.3 muestra los parámetros del crecimiento y metabolismo de hASC en normoxia y medio de cultivo α -MEM antiOX enriquecido, donde se exhibe un *fold change* de 6,22 que es significativamente mayor al control (medio α -MEM antiOX) y a los experimentos ejecutados del DoE. Además, muestra una mayor tasa específica de crecimiento, un menor consumo específico de glucosa, menor producción específica de lactato, mayor consumo específico de piruvato, y al observar la curva de crecimiento (ver Figura 5.8) es posible notar que alcanza un mayor número de células en fase estacionaria. Respecto al rendimiento $\Delta L/\Delta G$, resulta ser mayor para el medio α -MEM antiOX enriquecido, sin embargo, al evaluar el $\Delta L/\Delta C$ se obtiene un valor de 1,14 que es significativamente menor al control (1,34). Lo anterior da cuenta de una mayor eficiencia en el aprovechamiento de las fuentes de carbono en la producción de energía con OxPhos [100, 154] y en rutas de biosíntesis.

Tabla 5.3: Parámetros del crecimiento y metabolismo de hASC en normoxia utilizando medio α -MEM antiOX enriquecido

Experimento	Control	Óptimo
Pyr (mM)	1	6,29
Nam (mM)	0,0082	6,37
$\mu_{m\acute{a}x}$ (día ⁻¹)	0,660	0,746
t_d (h)	25,2	22,3
FC	4,76	6,22
qG (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)	0,619	0,458
qL (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)	1,053	0,865
qP (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)	0,209	0,357
$\Delta L/\Delta G$	1,71	1,89
$\Delta L/\Delta C$	1,34	1,14

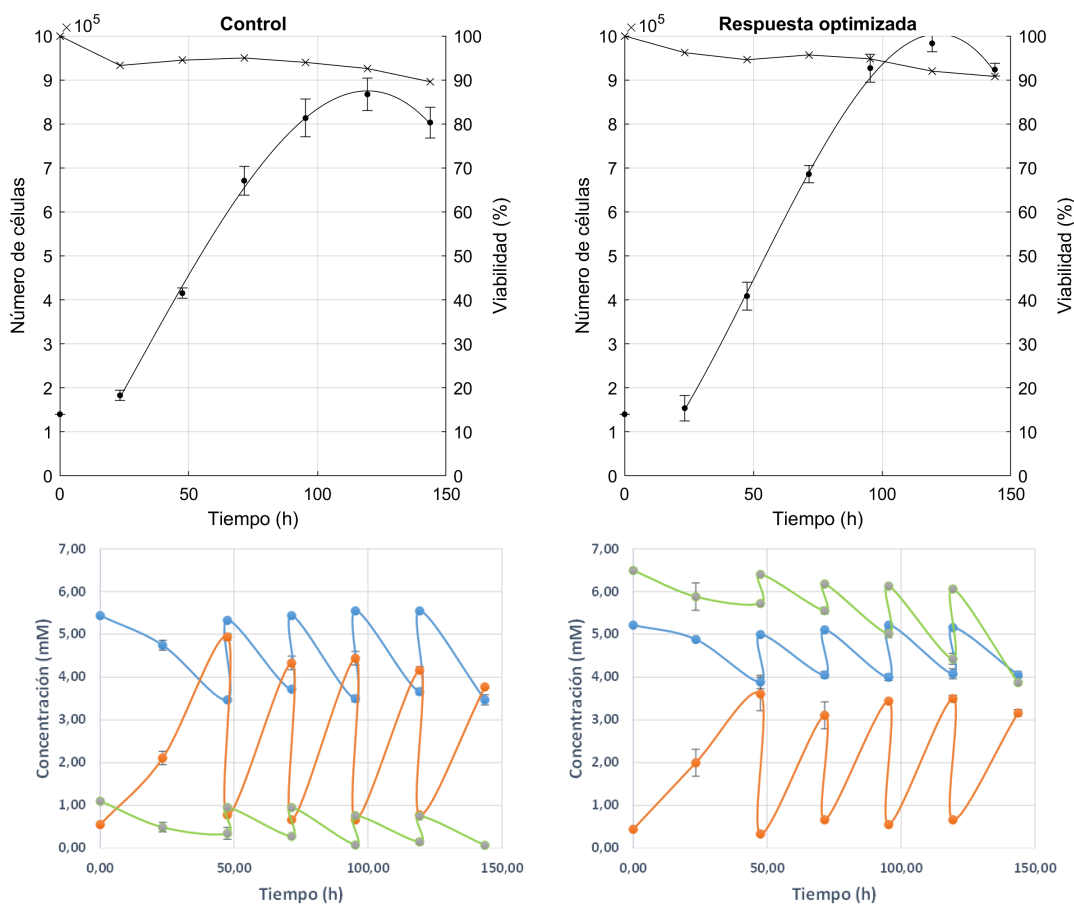


Figura 5.8: Cultivo en α -MEM antiOX y en α -MEM antiOX enriquecido bajo normoxia. Arriba curvas de crecimiento, abajo concentración de metabolitos. \bullet : número de células, \times : viabilidad, \bullet : concentración de glucosa, \times : concentración de lactato, y \bullet : concentración de piruvato (las barras de error corresponden a desviación estándar para $n = 2$ cultivos).

La Tabla 5.4 muestra los parámetros del crecimiento y metabolismo de hASC en medio de cultivo α -MEM antiOX enriquecido bajo la condición hipóxica. El cultivo optimizado muestra un *fold change* de 5,2 que es mayor al control y también alcanza un número de células superior (ver Figura 5.9), sin embargo, el *fold change* no es mayor respecto a los experimentos ejecutados del DoE (el experimento 9 reporta un *fold change* de 5,3). Para encontrar las concentraciones de piruvato y nicotinamida que reporten una respuesta significativamente mayor en condición hipoxica se puede reducir el dominio experimental, iterar un nuevo diseño de experimentos y evaluar las concentraciones en el punto estacionario para concluir si el sistema continua siendo subóptimo o no [159, 160].

Además, las hASC cultivadas en medio de cultivo α -MEM antiOX enriquecido bajo condición hipóxica muestran menor consumo específico de glucosa, menor producción específica de lactato, mayor consumo específico de piruvato, menor rendimiento $\Delta L/\Delta G$ y menor rendimiento $\Delta L/\Delta C$, dando cuenta de una mayor eficiencia en el aprovechamiento de las fuentes de carbono [100, 154]. Al observar la curva de crecimiento (ver Figura 5.9) es posible notar que alcanza un mayor número de células en fase estacionaria.

Observando el perfil de metabolitos en las Figuras 5.8 y 5.9, es posible notar que la variación de la concentración de piruvato no es despreciable, por lo tanto, el régimen de alimentación de medio de cultivo fresco en modo *repeated-batch* (lotes repetitivos) [16] no permite mantener constantes las concentraciones óptimas de piruvato. En particular, al termino el cultivo el piruvato llega hasta una concentración de 3,87 mM en condición normóxica y a 2,13 mM en condición hipóxica, concentraciones que son significativamente menores a las óptimas. Por lo anterior, sería recomendable realizar los experimentos en un régimen de alimentación en modo perfusión donde se garantiza que las concentraciones de los nutrientes permanezcan relativamente estables a lo largo del cultivo [16], y así evaluar el impacto efectivo de las diferentes concentraciones de piruvato y nicotinamida en el crecimiento de hASC. De todas formas, tanto en normoxia como en hipoxia se obtienen mejores desempeños en los cultivos con concentraciones óptimas de piruvato y nicotinamida (en términos de *fold change*) utilizando el modo *repeated-batch*.

Tabla 5.4: Parámetros del crecimiento y metabolismo de hASC en hipoxia utilizando medio α -MEM antiOX enriquecido

Experimento	Control	Óptimo
Pyr (mM)	1	3,82
Nam (mM)	0,0082	2,80
$\mu_{m\acute{a}x}$ (día ⁻¹)	0,660	0,648
t_d (h)	25,2	25,7
FC	4,71	5,20
qG (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)	0,728	0,589
qL (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)	1,321	1,088
qP (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)	0,195	0,323
$\Delta L/\Delta G$	2,23	2,04
$\Delta L/\Delta C$	1,75	1,32

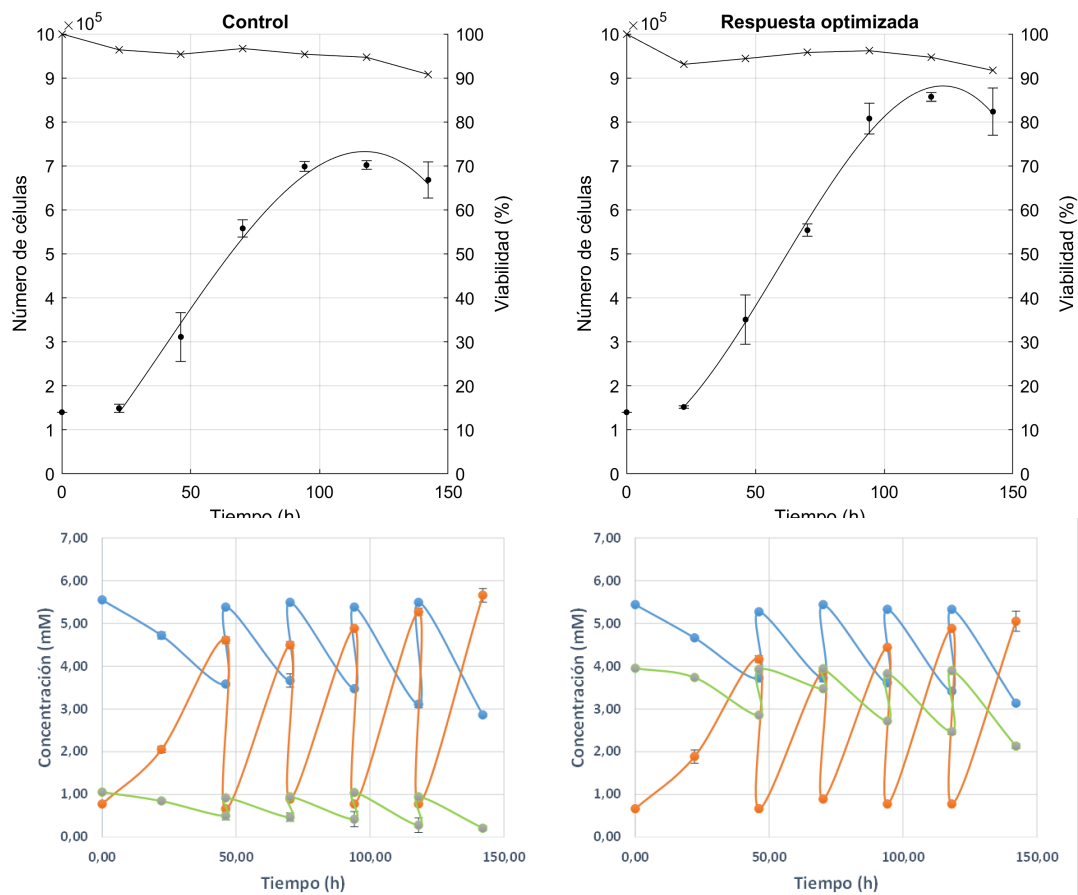


Figura 5.9: Cultivo en α -MEM antiOX y en α -MEM antiOX enriquecido bajo hipoxia. Arriba curvas de crecimiento, abajo concentración de metabolitos. ●: número de células, - × -: viabilidad, - ● -: concentración de glucosa, - ● -: concentración de lactato, y - ● -: concentración de piruvato (las barras de error corresponden a desviación estándar para $n = 2$ cultivos).

Como se mencionó anteriormente, tanto en normoxia como en hipoxia al utilizar medio α -MEM antiOX enriquecido se reporta una mayor tasa de consumo de piruvato. Lo anterior puede ocurrir porque el transporte a través del transportador de monocarboxilato 2 (MCT2), encargado del ingreso del piruvato a las células humanas [102, 103], es sensible a las concentraciones de piruvato en el medio extracelular e intracelular [103, 104]. Considerando que el medio α -MEM antiOX enriquecido posee mayor concentración de piruvato en comparación al control, entonces la tasa de ingreso de piruvato podría aumentar, y por consiguiente, podría incrementarse la tasa de consumo específico de piruvato. De todas formas, se necesitan más antecedentes con modelos de células madre humanas para corroborar (o descartar) esta idea.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el medio α -MEM antiOX enriquecido en condición normóxicas muestra el mejor desempeño para el crecimiento de hASC, por lo tanto, se continuó trabajando con este cultivo para los siguientes experimentos. De todas formas, si se piensa utilizar las hASC expandidas *in vitro* como un trasplante para pacientes, entonces sería conveniente seguir explorando la condición de hipoxia considerando que eventualmente el ambiente en el cual van a residir las células madre puede tener bajos niveles de oxígeno, lo que provocaría un estrés metabólico y reduciría las posibilidades de sobrevivencia y retención de las células en el tejido [43].

5.1.2. Respecto a la metodología de optimización

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) permitió encontrar concentraciones óptimas de piruvato y nicotinamida en condición normoxica que maximizan el *fold change*. De todas formas, es importante evaluar qué parámetros son los más convenientes por optimizar en la expansión de células madre mesenquimales. En los cultivos en monocapa, el crecimiento de las hASC comienza a desacelerar rápidamente desde las 100 h producto de la inhibición por contacto [151], mientras que en los cultivos en suspensión se puede elevar progresivamente la superficie de cultivo [80] prolongando significativamente el tiempo del mismo. Considerando lo anterior, en cultivos en monocapa puede ser conveniente seguir utilizando el *fold change* como parámetro de respuesta, mientras que en cultivos en suspensión puede ser conveniente optimizar la tasa específica máxima de crecimiento ya que los factores inhibitorios del crecimiento (acumulación de desechos, competencia por los nutrientes y competencia por el espacio [150]) están relativamente atenuados y la fase exponencial se podría extender significativamente en el tiempo.

Una alternativa para optimizar tanto el *fold change* como la tasa de crecimiento (o incluso más parámetros) de forma simultánea es el método de la función de deseabilidad global [130]. En este caso, todos los valores de los parámetros se normalizan, se les otorga una importancia (o peso) relativa y luego se estima el valor de la respuesta global ponderando cada parámetro (por lo general, se utiliza la media geométrica ponderada) [130]. De esta forma, se pueden considerar todos los parámetros que se deseen optimizar.

Por otro lado, a pesar de que el piruvato y la nicotinamida mostraron tener efectos en el crecimiento de hASC, se sabe que existen más componentes y condiciones del medio de cultivo que tienen impacto sobre el cultivo de hMSC como factores de crecimiento, citoquinas, aminoácidos esenciales, glutamina, concentración de oxígeno, y glucosa [98, 128, 127, 161], cuyos niveles pueden ser optimizados para generar una formulación de medio de cultivo específica para el rápido crecimiento de hASC. Sin embargo, para evaluar el impacto de todos los componentes del medio de cultivo por medio de RSM sería necesario ejecutar un Diseño de Experimentos (DoE) extenso (para k factores y 1 punto central se requieren $2^k + 2 \cdot k + 1$ experimentos [130], así solo para 3 factores se necesitarían 15 experimentos), lo cual implicaría invertir en una gran cantidad de materiales y tiempo de trabajo. Una alternativa para evitar ejecutar un excesivo número de experimentos es el *model-assisted* DoE [160, 162, 163].

El *model-assisted* DoE (mDoE) es una herramienta que combina modelos matemáticos de organismos vivos y el Diseño de Experimentos [162, 163] donde las respuestas del cultivo celular son simuladas en base a un modelo del bio-proceso [160], es decir, los valores de las respuestas de cada experimento del DoE pueden ser estimadas *in silico* y luego ser ajustadas a un Modelo de Superficie de Respuesta para encontrar los niveles óptimos de cada factor. Utilizando el mDoE se ha podido reducir el número de experimentos ejecutados desde 29 (DoE convencional) a 4 (mDoE) permitiendo optimizar el cultivo de células mamíferas utilizando modelos de balances de biomasa, sustratos, metabolitos y productos de interés en función de concentraciones de glucosa y glutamina [160, 163]. De esta forma, con el mDoE sería posible encontrar los niveles óptimos de distintos componentes y condiciones del medio de cultivo para la expansión de hASC.

5.2. Propiedades de células madre

Considerando que las hASC cultivadas en medio α -MEM antiOX enriquecido bajo normoxia exhiben la mayor cinética de crecimiento, se evalúan las propiedades troncales de células madre únicamente de este cultivo.

Se sabe que el entorno nutricional, en particular, la concentración de piruvato y nicotinamida en el medio de cultivo poseen efectos sobre la diferenciación de células madre [164, 165], lo que podría provocar una disminución del *stemness*. Para evaluar si las hASC cultivadas en medio α -MEM antiOX enriquecido bajo normoxia conservan sus propiedades troncales se estudia el panel de marcadores de superficie característico de células madre mesenquimales mediante citometría de flujo (ver Anexo B) además de su potencial de diferenciación a 3 linajes mediante inducción y posterior tinción.

La Tabla 5.5 muestra la población relativa (de un total de ~ 10.000 eventos) de células positivas para los marcadores CD45, CD34, CD90, CD105, CD44, CD73, CD19, CD29, CD11b y HLA-DR. En particular, de acuerdo a la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), para que una población de células pueda ser tipificada como un conjunto de células madre mesenquimales, se debe cumplir que $\geq 95\%$ de la población muestre positividad para CD105, CD73 y CD90, y que $\leq 2\%$ muestre positividad para CD45, CD34, CD11b, CD19 y HLA-DR (característicos del linaje hematopoyético) [166]. Además se han identificado nuevos marcadores que están presentes en la superficie de hMSC como CD29 y CD44 [167, 168].

Tabla 5.5: Inmunotipificación de marcadores de superficie

Marcador	Células positivas	
	α -MEM antiOX	α -MEM antiOX enriquecido
CD45	0,4 %	0,1 %
CD34	0,3 %	0,1 %
CD90	99,4 %	99,6 %
CD105	89,9 %	90,4 %
CD44	94,8 %	98,2 %
CD73	99,7 %	99,3 %
CD19	0,5 %	1,9 %
HLA-DR	0,1 %	0,6 %
CD11b	0,4 %	0,1 %
CD29	99,9 %	100,0 %

De acuerdo a la Tabla 5.5, es posible notar que las hASC cultivadas en α -MEM antiOX enriquecido exhiben una positividad $\leq 2\%$ para los marcadores CD45, CD34, CD11b, CD19 y HLA-DR cumpliendo con el criterio de la ISCT. Por otro lado, las hASC cultivadas en α -MEM antiOX enriquecido exhiben una positividad $\geq 95\%$ para CD73, CD90, CD44 y CD29, pero CD105 solo alcanza una positividad del 90,4%. De todas formas, CD105 posee una positividad del 89,9% en hASC control, por lo tanto, puede haber habido un error de procedimiento en la preparación de las muestras, o las hASC sufrieron una variación en la

expresión de este marcador durante el cultivo que es independiente de las composiciones de enriquecimiento.

En la Figura 5.10 se visualiza el ensayo de diferenciación adipogénica. Se observa que las hASC cultivadas en medio α -MEM antiOX enriquecido exhiben acumulación de cuerpos lipídicos intracelulares, cuyos ácidos grasos que se tiñen con aceite rojo O [169]. Lo anterior da cuenta que las hASC expandidas en α -MEM antiOX enriquecido conservan el potencial de diferenciación adipogénico.

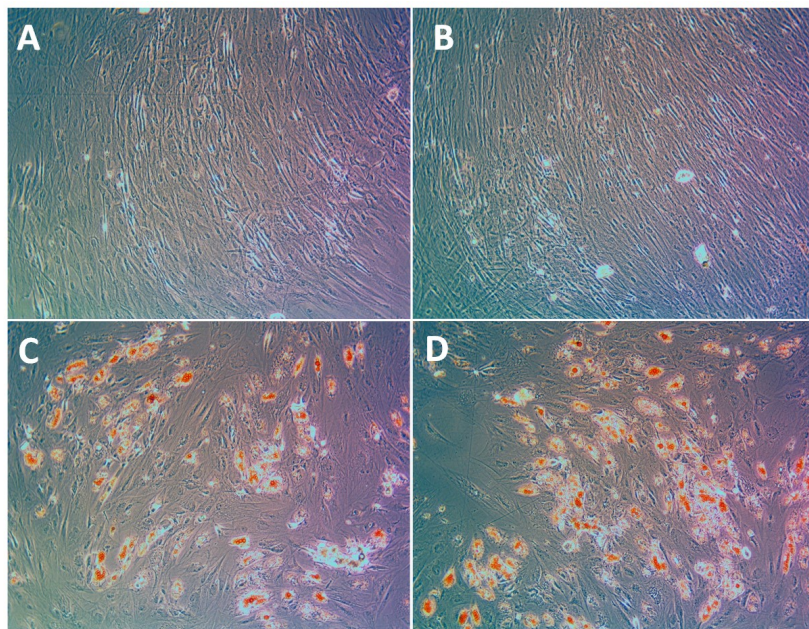


Figura 5.10: Diferenciación adipogénica. A) Control de α -MEM antiOX, B) Control de α -MEM antiOX enriquecido, C) Diferenciado de α -MEM antiOX, y D) Diferenciado de α -MEM antiOX enriquecido.

La Figura 5.11 muestra el ensayo de diferenciación condrogénica. Se observa que las hASC cultivadas en α -MEM antiOX enriquecido quedan teñidas con safranina que se une a los glucosaminoglicanos característicos de los cartílagos [170]. En particular, se hubiera esperado obtener un agregado celular durante la etapa de condensación celular donde las MSC comienzan a compactarse y formar una masa celular densa [171, 172], lo cual no se logró observar hasta los 14 días de inducción, por lo que se decide extender el proceso de condrogénesis hasta los 20 días, sin embargo, no se obtienen resultados satisfactorios.

Lo anterior puede haber ocurrido porque la siembra se realizó a una densidad celular baja cuya confluencia no permitió una interacción temprana entre las hASC para la formación del agregado celular, o se puede evaluar el uso de pocillos con superficies de baja adhesión celular (*Ultra-Low Attachment*) como los utilizados en la formación de esferoides [88]. De todas formas, se observa que las hASC cultivadas en α -MEM antiOX enriquecido exhiben una alta secreción de glucosaminoglicanos, por lo tanto, existe potencialidad para diferenciarse en condrocitos.

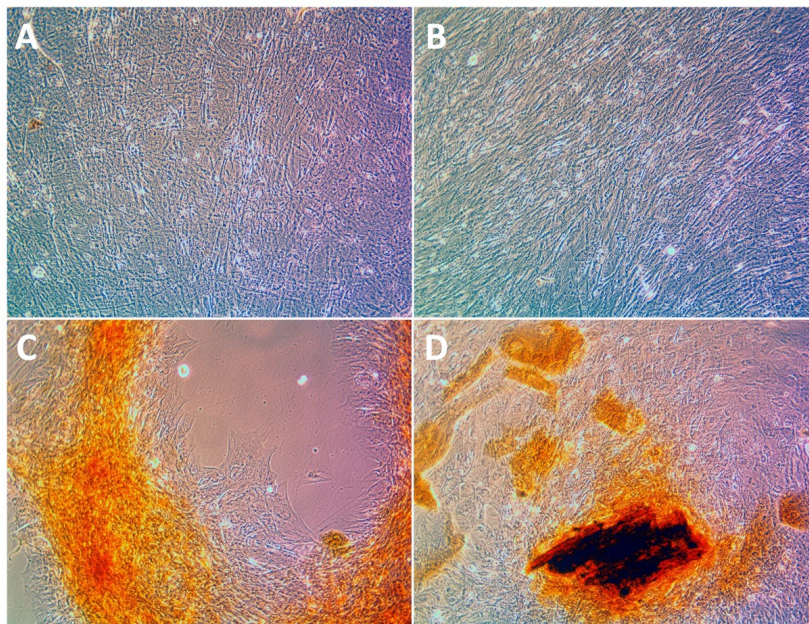


Figura 5.11: Diferenciación condrogénica. A) Control de α -MEM antiOX, B) Control de α -MEM antiOX enriquecido, C) Diferenciado de α -MEM antiOX, y D) Diferenciado de α -MEM antiOX enriquecido.

La Figura 5.12 muestra el ensayo de diferenciación osteogénica. Se visualiza que las hASC cultivadas en α -MEM antiOX enriquecido acumulan depósitos de calcio en el medio extracelular que quedan teñidos con alizarina roja O [173], dando cuenta que las hASC conservan la potencialidad de convertirse en osteocitos.

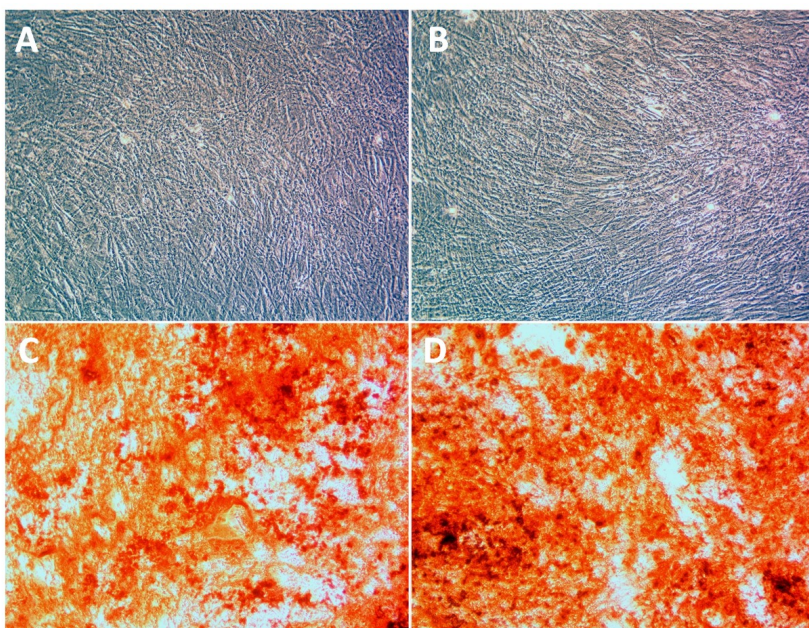


Figura 5.12: Diferenciación osteogénica. A) Control de α -MEM antiOX, B) Control de α -MEM antiOX enriquecido, C) Diferenciado de α -MEM antiOX, y D) Diferenciado de α -MEM antiOX enriquecido.

Para hacer una comparación entre el potencial de diferenciación de las células cultivadas en medio α -MEM antiOX y α -MEM antiOX enriquecido se recomienda realizar ensayos cuantitativos. Las metodologías convencionales se basan en la medición de absorbancia del tinte eluido desde las células diferenciadas, sin embargo, estos ensayos requieren tiempo para ser realizados, no son automáticos y poseen baja reproducibilidad. Una alternativa más prometedora es el Análisis de Imágenes Digitales (DIA) donde se capturan imágenes de microscopía óptica del cultivo previamente teñido con los tintes y se procesan por un *software* especializado [174].

5.3. Cultivo en suspensión

Habiendo validado el impacto positivo en el crecimiento de hASC del medio α -MEM antiOX enriquecido en normoxia, se probó su efectividad en un cultivo en suspensión en *spinner flask* de fondo curvo con *microcarriers* Cytodex® 1. Se hablará del medio α -MEM antiOX enriquecido como un medio de cultivo “candidato a óptimo” considerando que no se utilizó ninguna metodología de optimización para cultivos 3-D.

Tabla 5.6: Parámetros del crecimiento y metabolismo de hASC en suspensión bajo normoxia

Experimento	Control	Candidato a óptimo
Pyr (mM)	1	6,29
Nam (mM)	0,0082	6,37
$\mu_{m\acute{a}x}$ (día ⁻¹)	0,257 ± 0,068	0,168 ± 0,124
t_d (h)	64,8 ± 18,1	99,0 ± 288,8
FC	6,81 ± 0,36	2,70 ± 1,43
qG (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)	0,231 ± 0,048	0,035 ± 0,004
qL (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)	0,420 ± 0,06	0,095 ± 0,009
qP (pmol·h ⁻¹ ·cel ⁻¹)	0,035 ± 0,004	0,050 ± 0,003
$\Delta L/\Delta G$	1,82 ± 0,03	2,19 ± 0,34
$\Delta L/\Delta C$	1,58 ± 0,02	1,04 ± 0,08

La Tabla 5.6 muestra los parámetros de crecimiento celular y metabolismo de hASC cultivadas en suspensión. El *fold change* para el cultivo candidato a óptimo es de 2,7 mientras que para el cultivo control (α -MEM antiOX) es de 6,81 y, respecto a la tasa específica de crecimiento, para el cultivo candidato a óptimo es de 0,168 día⁻¹ y para el cultivo control es de 0,257 día⁻¹. Lo anterior hace suponer que el medio de cultivo α -MEM antiOX es más favorable para el cultivo de hASC en suspensión. Por otro lado, las hASC cultivadas en medio de cultivo candidato a óptimo exhiben un menor consumo específico de glucosa, menor producción específica de lactato, mayor consumo específico de piruvato, y menor rendimiento de lactato a partir de fuentes de carbono, por lo tanto, la eficiencia en el aprovechamiento de los nutrientes es mayor en el cultivo candidato a óptimo.

Respecto a los valores específicos de las tasas de consumo/producción de glucosa y lacta-

to, se estima un q_G de $0,035 \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cel}^{-1}$ y un q_L de $0,095 \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cel}^{-1}$ en promedio para el cultivo candidato a óptimo. Estas estimaciones (a diferencia del cultivo control) se encuentran un orden de magnitud por debajo de valores reportados en estudios con hASC (Schop *et al.* reportó un q_G de $0,383 \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cel}^{-1}$ en α -MEM 15% SFB [100], Muoio *et al.* reportó un q_G de $0,15 \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cel}^{-1}$ y un q_L de $0,417 \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cel}^{-1}$ en un medio *xeno free* [175]). Esto puede deberse a que las hASC cultivadas en el medio α -MEM antiOX enriquecido, a pesar de entrar en fase exponencial al término del cultivo (probablemente una fase exponencial temprana donde la tasa de duplicación aún no es máxima [147]), aún no estabilizan su estado metabólico sino que están adaptándose al nuevo entorno nutricional, se sabe incluso que el consumo de glucosa y la producción de lactato de hASC pueden variar de acuerdo a las condiciones del cultivo [98, 176]. Por lo general, durante la fase exponencial se asume un estado (pseudo) estacionario de las tasas de consumo/producción de metabolitos en algunos cultivos de células mamíferas [177, 178, 179], por lo tanto, se recomienda caracterizar el metabolismo en esta etapa del crecimiento, por lo menos, para una primera aproximación.

La Figura 5.13 muestra las curvas de crecimiento y variación de la concentración de metabolitos. El cultivo en α -MEM antiOX enriquecido no supera las $3,7\times 10^7$ células en promedio a diferencia del cultivo en α -MEM antiOX que se eleva por sobre $8,8\times 10^7$ células en promedio. De todas formas, sería conveniente realizar un cultivo en triplicado considerando la gran dispersión de los datos en la fase exponencial de la curva de crecimiento del cultivo candidato a óptimo, donde se estima una desviación estándar que supera las $2,2\times 10^7$ células. Considerando que el cultivo en α -MEM antiOX enriquecido no alcanzó un elevado número de células, se optó por no escalar el volumen manteniéndolo en los 50 mL iniciales. Por el contrario, el volumen del cultivo en α -MEM antiOX se aumentó a 75 mL el día 4 y a 100 mL el día 7, agregando medio de cultivo fresco y *microcarriers* para mantener la concentración de 8 g/L. Cuando se incorporan *microcarriers* “desnudos” al medio de cultivo aumenta la superficie volumétrica del mismo y las células madre pueden migrar hacia estos nuevos *microcarriers* (*bead-to-bead transfer*) incluso en agitación continua, reduciendo así la posibilidad de agregación de las células [80]. De todas formas, al observar la Figura 5.14 es posible notar que se forman agregados de *microcarriers* en el cultivo control, por lo tanto, sería conveniente evaluar el uso de una agitación intermitente inmediatamente después de la adición de los *microcarriers* frescos para reducir el grado de agregación [80] y para favorecer la migración efectiva de las hASC.

Por otro lado, es posible notar que la fase *lag* del crecimiento es más extensa para el cultivo en α -MEM antiOX enriquecido. La fase *lag* esta caracterizada por la reconstrucción del citoesqueleto y la secreción de matriz extracelular para facilitar la unión con la superficie de cultivo luego de la tripsinización [180, 181].

En particular, la hidratación de los *microcarriers* y el “equilibrio” del medio de cultivo (alcanzar la temperatura deseada, el pH deseado, el equilibrio de gases, etc.) deben ocurrir correctamente antes de la inoculación para que la adhesión (*attachment*) de las células a la superficie de cultivo sea óptima [13, 182, 183]. Al observar la Figura 5.14 es posible notar que parte de los *microcarriers* en el cultivo candidato a óptimo tienen un centro iluminado, que se presume podrían ser burbujas (aunque no es concluyente), siendo aparentemente un indicador de una hidratación deficiente del lote de *microcarriers* utilizado en este cultivo (que no fue preparado simultáneamente con el lote de *microcarriers* utilizado en el cultivo

control), lo que puede haber influido en el extenso periodo de la fase *lag* del crecimiento.

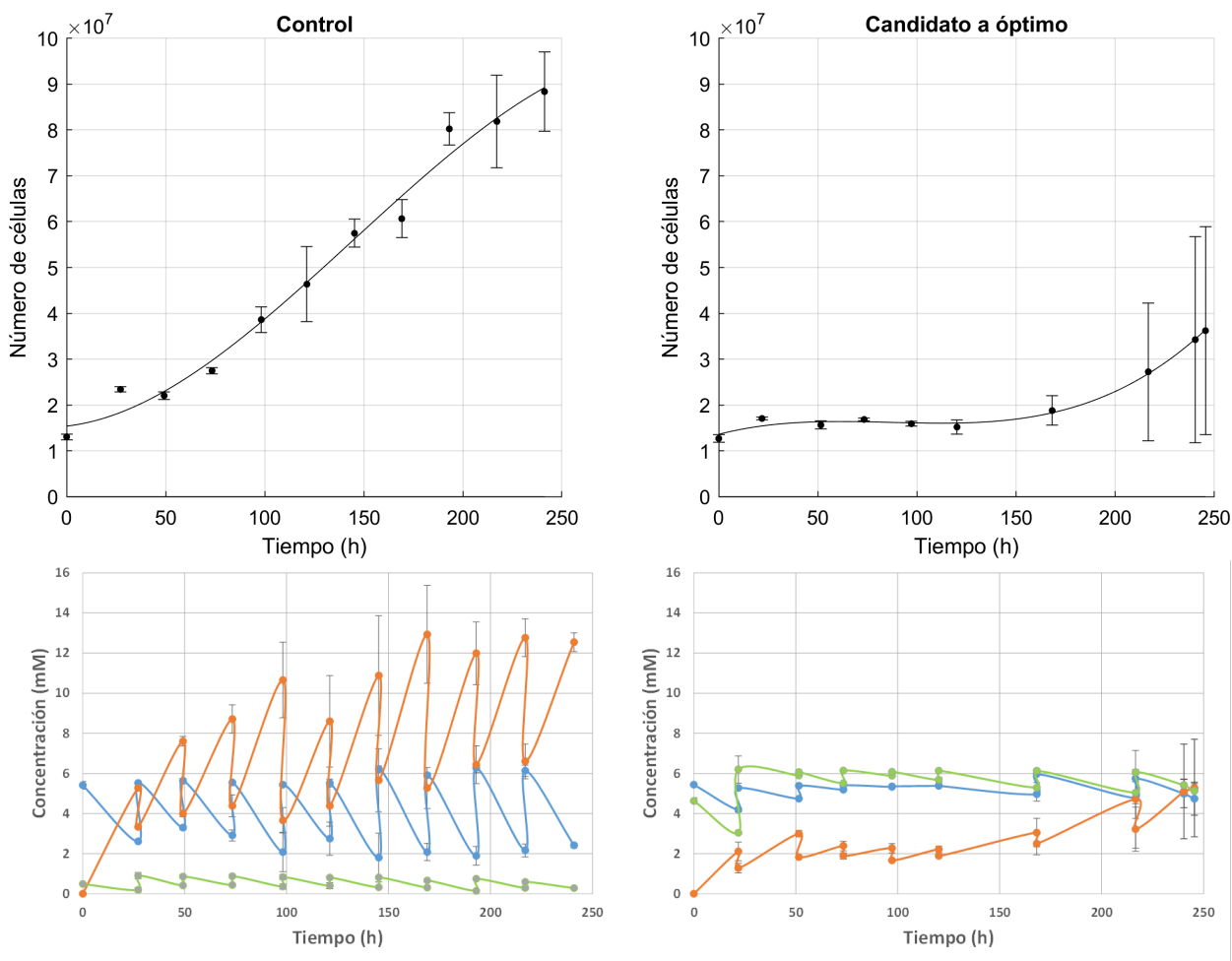


Figura 5.13: Cultivo en suspensión con α -MEM antiOX y α -MEM antiOX enriquecido bajo normoxia. Arriba curvas de crecimiento, abajo concentración de metabolitos. ●: número de células, —●—: concentración de glucosa, —●—: concentración de lactato, y —●—: concentración de piruvato (las barras de error corresponden a desviación estándar para $n = 2$ cultivos).

Por otro lado, al observar la Figura 5.13, es posible notar que para el cultivo en α -MEM antiOX enriquecido, aproximadamente entre los tiempos 97 y 120 h, no existe variación en la concentración de glucosa, por lo tanto, durante 23 h no hay consumo neto evidente de este nutriente. Por el contrario, el piruvato se consume durante todo el periodo de cultivo, reportando la menor variación de concentración entre los tiempos 73 y 97 h. Lo anterior puede dar cuenta de un *switch* o cambio metabólico hacia un mayor aprovechamiento del piruvato como fuente de carbono. En particular, la fase *lag* es un periodo de adaptación al nuevo entorno de cultivo donde las células aumentan en masa y volumen sin duplicarse, y su extensión puede depender de la viabilidad del inóculo, la fase del crecimiento en la que se encuentran las células al subcultivar [184, 185] y la composición del medio de cultivo [12]. Considerando que las hASC se expanden previamente en medio α -MEM antiOX y luego pasan a un medio enriquecido en piruvato (y nicotinamida), entonces debe existir una adaptación al nuevo entorno nutricional provocando que la fase *lag* del crecimiento se extienda significativamente

en comparación al control.

Para reducir el impacto del cambio a un nuevo entorno nutricional, se recomienda inocular el cultivo en suspensión utilizando el mismo medio de expansión (en este caso α -MEM antiOX) y enriquecerlo progresivamente hasta llegar a los 6,29 mM de piruvato y 6,37 mM de nicotinamida, por ejemplo, en un periodo de 4 días considerando que en el tiempo 97 h se aprecia un aparente *switch* metabólico. Por otro lado, se podría expandir las hASC en las condiciones de enriquecimiento antes de la inoculación del cultivo en suspensión y así adaptarlas previamente. Adicionalmente, se debe considerar que la concentración de nicotinamida no fue monitorizada, por lo tanto, no se puede garantizar *a priori* que durante el cultivo candidato a óptimo se alcance el nivel de enriquecimiento de 6,37 mM. A diferencia de los cultivos en monocapa, donde se recambió completamente el medio de cultivo por medio fresco, en los cultivos en suspensión sólo se recambió una fracción del volumen del medio, por lo tanto, si la nicotinamida es consumida por las hASC, entonces el volumen remanente quedaría en concentraciones inferiores a 6,37 mM. Esto podría explicar también el rendimiento deficiente del cultivo candidato a óptimo.

La Figura 5.14 muestra la evolución del cultivo en el tiempo visualizado bajo microscopía. Es posible observar, que el cultivo control alcanza confluencias mayores en menor tiempo en comparación al cultivo candidato a óptimo. El día 10 se ven agregados de *microcarriers* tanto en el control como en el candidato a óptimo. En ambos casos, al interior del área interna gobierna la difusión para el intercambio de nutrientes [79], lo que es más ineficiente que el transporte por convección. Además, la agregación reduce la superficie de cultivo para el crecimiento de MSC impactando en la proliferación de las mismas [85], por lo tanto, se deben pensar en medidas de mitigación como la agitación intermitente luego de agregar nuevos *microcarriers* como se mencionó anteriormente, o aumentar la velocidad de agitación a niveles óptimos mientras transcurre el tiempo de cultivo para garantizar la suspensión efectiva de los *microcarriers* más pesados al cargar mayor cantidad de células [80].

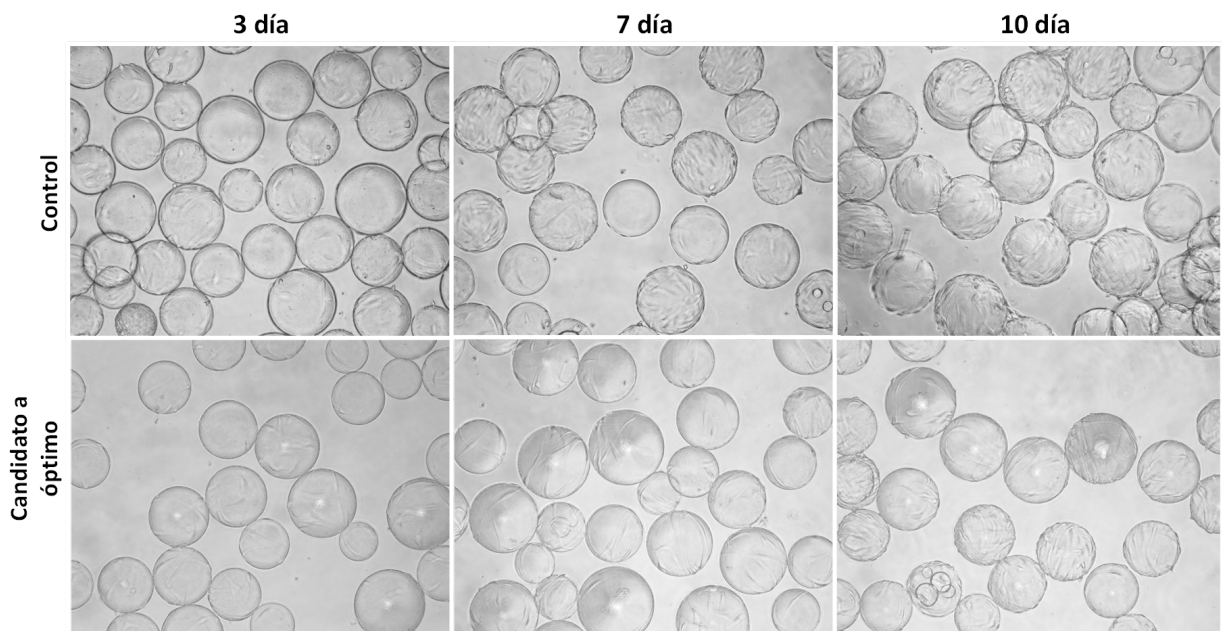


Figura 5.14: Visualización de cultivo en suspensión con *microcarriers*.

5.3.1. Respecto al escalamiento del cultivo

El número de células que se pudieron obtener en los cultivos en suspensión es significativamente mayor al obtenido en los cultivos en monocapa, tanto si se utiliza el medio α -MEM antiOX como el α -MEM antiOX enriquecido. Sin embargo, las tasas específicas de crecimiento son menores a las obtenidas en los cultivos en monocapa. Esto puede deberse a que en los cultivos agitados existe esfuerzo de corte y hay una baja acumulación de factores de crecimiento y factores paracrinos [86]. Para subsanar estas deficiencias se puede explorar el uso de surfactantes como Pluronic F68 que protege a las células del esfuerzo de corte [21, 80], y el uso de suero humano, lisado de plaquetas o plasma rico en plaquetas [80, 186, 187], que han mostrado ser una fuente de factores de crecimiento que incrementan la proliferación de células madre mesenquimales [186, 187].

Adicionalmente, se podrían explorar distintas configuraciones del sistema de agitación. En particular, los *impellers* (impulsores) de flujo axial requieren menor energía para suspender los *microcarriers* en comparación a los de flujo radial [188], además los flujos orientados axialmente son beneficiosos para la expansión de hMSC [189]. Se ha reportado que los *impellers* de tipo *pitched-blade* permiten agitar el cultivo a bajas velocidades reduciendo el esfuerzo de corte [21]. Sin embargo, en este estudio se utilizaron *spinner flask* los que poseen sistemas de agitación de flujo radial [79], por lo tanto, se podría explorar el escalamiento del cultivo en biorreactores de tanque agitado.

5.4. Proyecciones

La manipulación del metabolismo permitiría mejorar el desempeño terapéutico de las hMSC, ya sea para favorecer la retención en el tejido, la sobrevivencia, la inmunomodulación, o la diferenciación [190], y los modelos metabólicos han ayudado a predecir las mejores condiciones para una expansión a gran escala [190]. Por lo anterior, comprender cómo evoluciona el estado metabólico de hMSC ante distintos entornos nutricionales es crítico para poder desarrollar una terapia efectiva.

En este trabajo se observó que el piruvato y la nicotinamida impactan en el metabolismo y crecimiento de hASC. Además, se mostró que el piruvato es un sustrato de hASC cuya tasa de consumo no es despreciable y depende de su disponibilidad en el medio de cultivo y la tensión de oxígeno, al igual que el consumo de glucosa y la producción de lactato. Estos resultados permitirían dar pie a la construcción de un modelo metabólico específico para hASC que puede ser eventualmente complejizado incorporando la regulación de transcripción de enzimas para generar, por ejemplo, un modelo a escala genómica [190]. En particular, las tasas de producción/consumo de metabolitos pueden ser utilizadas como restricciones para los modelos, las cuales son estimadas por medio de la medición de los cambios de concentración en el medio de cultivo [190]. En particular, en este trabajo no se monitorizó la concentración de nicotinamida, sin embargo, en estudios futuros se podría medir por espectrofotometría mediante la reacción König [191], y así determinar si la nicotinamida es efectivamente un sustrato y cómo varía su consumo ante distintas condiciones del cultivo.

Las hASC cultivadas en el medio α -MEM antiOX enriquecido mantienen el perfil de marcadores de superficie y el potencial de diferenciación en 3 linajes, por lo tanto, podrían ser

utilizadas en terapia celular y medicina regenerativa. De todas formas, aún es necesario estandarizar el proceso de expansión en condiciones *xeno free*, esto es prescindir del uso de SFB y tripsina (ambos derivados de animales). Como se mencionó en secciones anteriores el SFB podría ser reemplazado por suero humano, lisado de plaquetas o suero rico en factores, y considerando que los experimentos se realizaron en baja concentración de SFB (5%), entonces los niveles de enriquecimiento óptimos de piruvato y nicotinamida podrían servir como puntos de partida para la adaptación a un medio libre de xenógenos. Respecto al uso de tripsina (de origen porcino) para desprender las células, podría ser reemplazada por TrypLE, una enzima recombinante comercial [192]. Esta enzima además ha sido utilizada para la cosecha de hMSC expandidas en *microcarriers* [80], lo que permitiría recuperar las hASC y utilizarlas eventualmente para fines médicos.

Respecto al escalamiento, los cultivos en suspensión con *microcarriers* son mejor alternativa en comparación a cultivos en monocapa para alcanzar grandes cantidades de hASC, no sólo porque se logra un rendimiento volumétrico máximo mayor (comparando los cultivos con mejor rendimiento, en suspensión en α -MEM antiOX se obtienen ~ 880.000 cel/mL mientras que en monocapa en α -MEM antiOX enriquecido bajo normoxia se obtienen ~ 327.000 cel/mL), sino también porque el volumen (y superficie) de cultivo puede ser escalada progresivamente sin que exista una desaceleración significativa del crecimiento. Lo anterior permitiría alcanzar cantidades de hASC suficientes para fines terapéuticos utilizando una misma unidad de cultivo (*spinner flask* o tanque agitado) evitando incurrir en una rutina constante de pasajes como ocurre con cultivos en monocapa. De todas formas, el esfuerzo de corte generado por la agitación debe ser minimizado considerando que las hMSC son altamente sensibles a este estímulo mecánico [193], al igual que la formación de agregados de *microcarriers*. En particular, Jossen *et al.* probó 6 niveles de agitación (25, 43, 49, 63, 90 y 120 rpm) en *spinner flask* con *microcarriers*, de las cuales la agitación a 49 rpm permitió mantener la mayor cantidad de hASC y la mayor tasa específica de crecimiento [193]. Este nivel de agitación, no genera los menores esfuerzos de corte (en comparación a las 25 y 43 rpm) ni reporta la menor formación de agregados de *microcarriers* (en comparación a las 63, 90 y 120 rpm) [193], por lo tanto, pueden existir más variables que se deben considerar al momento de determinar la agitación que más favorezca el crecimiento de las células.

Capítulo 6

Conclusiones

El medio α -MEM antiOX (medio α -MEM suplementado con antioxidantes) desarrollado en la tesis de Lorna León [68], demostró un buen desempeño en el crecimiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC). En esta misma línea se continúa mejorando el medio de cultivo probando el enriquecimiento del medio α -MEM antiOX con piruvato y nicotinamida.

Para explorar el impacto de distintos niveles de enriquecimiento del medio en cultivo, se montó un Diseño de Experimentos (DoE) considerando distintas combinaciones de concentraciones de piruvato y nicotinamida en cultivos de hASC en monocapa bajo normoxia ($\sim 21\% \text{O}_2$) e hipoxia ($5\% \text{O}_2$). Al ejecutar el DoE fue posible observar que el piruvato y la nicotinamida tenían efectos sobre el crecimiento y el metabolismo de hASC al igual que la presión parcial de oxígeno. En particular, la tasa específica de crecimiento máxima varía entre $0,482\text{-}0,636 \text{ día}^{-1}$ en normoxia y $0,468\text{-}0,655 \text{ día}^{-1}$ en hipoxia; el tiempo de duplicación entre $26,2\text{-}34,5 \text{ h}$ en normoxia y $25,4\text{-}35,5 \text{ h}$ en hipoxia; y el *fold change* del número de células entre $3,84\text{-}4,96$ en normoxia y $3,11\text{-}5,30$ en hipoxia. Algunas condiciones fueron menos favorables para la proliferación que otras, lo que puede explicarse presumiblemente por los efectos de una osmolaridad elevada y el estrés oxidativo de los distintos estados metabólicos.

Para estimar las concentraciones óptimas se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) ajustando el *fold change* del número de células de los cultivos a un modelo de segundo orden. Luego de aplicar el modelo, se obtuvieron las concentraciones que maximizan el *fold change*: $6,29 \text{ mM}$ de piruvato y $6,37 \text{ mM}$ de nicotinamida para el cultivo en normoxia, y $3,82 \text{ mM}$ de piruvato y $2,8 \text{ mM}$ de nicotinamida para el cultivo en hipoxia. Al probar el medio α -MEM antiOX enriquecido se reportó un aumento del *fold change* del 31% y 10% en normoxia e hipoxia, respectivamente, comparado al medio basal (α -MEM antiOX) demostrando tener un mejor desempeño en el crecimiento de hASC. Adicionalmente, se observó un descenso del 15% y 24% del rendimiento de lactato a partir de glucosa más piruvato ($\Delta L/\Delta C$) en normoxia e hipoxia, respectivamente, demostrando una mayor eficiencia en el aprovechamiento de los nutrientes.

Considerando que el medio α -MEM antiOX enriquecido reportó el mejor desempeño en cuanto al crecimiento de hASC en condición normóxica, se realizaron ensayos para verificar si las hASC mantienen sus propiedades troncales. Respecto a la inmunotipificación de marcadores de superficie, la población de células muestra positividad superior al 90% para CD73, CD90, CD44, CD29 y CD105, mientras que muestra una positividad menor al 2%

para CD45, CD34, CD11b, CD19 y HLA-DR, por lo tanto, no existen cambios significativos en la expresión de marcadores. Respecto al potencial de diferenciación, las hASC conservaron su capacidad de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteoblastos.

Para probar el desempeño del medio α -MEM antiOX enriquecido en un cultivo en suspensión, se escaló el cultivo a un bioreactor tipo *spinner flask* con *microcarriers* Cytodex® 1 en condición normóxica. El cultivo con medio α -MEM antiOX enriquecido en suspensión no mostró un aumento del *fold change* sino que reportó una disminución del 60 % respecto a la condición basal sin superar las 37×10^6 células en promedio, lo cual se explica por la extensa fase *lag* a causa de una aparente adaptación a las nuevas condiciones nutricionales del medio de cultivo y deficiencias en algunos procedimientos experimentales. De todas formas, el $\Delta L/\Delta C$ fue significativamente menor para el medio α -MEM antiOX enriquecido, por lo tanto, puede seguir siendo promisorio explorar este medio para futuros cultivos en suspensión. Para reducir el tiempo de la fase *lag* se recomienda enriquecer el medio de cultivo del *spinner flask* de forma progresiva o expandir las hASC en las condiciones de enriquecimiento previamente a la inoculación.

En el cultivo en suspensión se logró escalar la superficie de cultivo adicionando *microcarriers* frescos manteniendo la concentración inicial de 8 g/L, lo que resulta en un crecimiento sostenido de las hASC durante todo el periodo de cultivo en α -MEM antiOX. Sin embargo, se observa la generación de agregados celulares, lo que es desfavorable para la proliferación, por lo tanto, se recomienda evaluar la agitación intermitente inmediatamente después de agregar los *microcarriers* frescos y/o incrementar la velocidad de agitación de forma proporcional al tiempo de cultivo.

En este trabajo se exploraron distintas estrategias de bioprocesos para la expansión de hASC y se evaluó su desempeño en base a la estimación de parámetros de cinética de crecimiento y estados metabólicos. Adicionalmente, se ofrece una primera aproximación a una metodología de optimización de las condiciones de cultivo basada en modelos estadísticos, la cual puede seguir perfeccionándose y acoplarse a modelos que describan el comportamiento de la población celular con el *model-assisted* DoE.

Bibliografía

- [1] Panina, Y. A., Yakimov, A. S., Komleva, Y. K., Morgun, A. V., Lopatina, O. L., Malinovskaya, N. A., Salmina, A. B. (2018). Plasticity of Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Regulation of Angiogenesis. *Frontiers in Physiology*, 9, 1656.
- [2] Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228.
- [3] Bajek, A., Gurtowska, N., Olkowska, J., Kazmierski, L., Maj, M., & Drewa, T. (2016). Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 64(6), 443–454.
- [4] Mazini, L., Ezzoubi, M., Malka, G. (2021). Overview of current adipose-derived stem cell (ADSCs) processing involved in therapeutic advancements: flow chart and regulation updates before and after COVID-19. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1).
- [5] Brown, J. C., & Katz, A. J. (2019). Stem Cells Derived From Fat. En *Principles of Regenerative Medicine*, pp. 295–305.
- [6] Caplan, A. I., & Sorrell, J. M. (2015). The MSC curtain that stops the immune system. *Immunology Letters*, 168(2), 136–139.
- [7] Rezanejad, H., Soheili, Z. S., Haddad, F., Matin, M. M., Samiei, S., Manafi, A., & Ahmadi, H. (2014). In vitro differentiation of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells into neural retinal cells through expression of human PAX6 (5a) gene. *Cell and Tissue Research*, 356(1), 65–75.
- [8] Palumbo, P., Lombardi, F., Siragusa, G., Cifone, M., Cinque, B., & Giuliani, M. (2018). Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1897.
- [9] Frontini-López, Y. R., Gojanovich, A. D., Masone, D., Bustos, D. M., & Uhart, M. (2018). Adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells: From the lab bench to the basic concepts for clinical translation. *Biocell*, 42(3), 66–77.
- [10] Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., & Hedrick, M. H. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 24(4), 150–154.
- [11] Baer, P. C., & Geiger, H. (2012). Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International*, 2012(812693), 1–11.
- [12] Panchalingam, K. M., Jung, S., Rosenberg, L., & Behie, L. A. (2015). Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review. *Stem*

- [13] Tavassoli, H., Alhosseini, S. N., Tay, A., Chan, P. P. Y., Weng Oh, S. K., & Warkiani, M. E. (2018). Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. *Biomaterials*, 181, 333–346.
- [14] Khazaei, S., Keshavarz, G., Bozorgi, A., Nazari, H., & Khazaei, M. (2021). Adipose tissue-derived stem cells: a comparative review on isolation, culture, and differentiation methods. *Cell and Tissue Banking*, 23(1), 1-16.
- [15] Riis, S., Zachar, V., Boucher, S., Vemuri, M. C., Pennisi, C. P., & Fink, T. (2015). Critical steps in the isolation and expansion of adipose-derived stem cells for translational therapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 17, 1-11.
- [16] Kropp, C., Massai, D., & Zweigerdt, R. (2017). Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells. *Process Biochemistry*, 59(2017), 244–254.
- [17] Bellani, C. F., Ajeian, J., Duffy, L., Miotto, M., Groenewegen, L., & Connon, C. J. (2020). Scale-Up Technologies for the Manufacture of Adherent Cells. *Frontiers in Nutrition*, 7(575146), 1-14.
- [18] Sherman, H., & Ferrie, A. (2022). Adipose-derived Human Mesenchymal Cell Production in Corning® HYPERStack® 36-layer Cell Culture Vessels. Corning Incorporated, Life Sciences.
- [19] Hassan, M. N. F. B., Yazid, M. D., Yunus, M. H. M., Chowdhury, S. R., Lokanathan, Y., Idrus, R. B. H., Law, J. X. (2020). Large-Scale Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2020(9529465), 1–17.
- [20] Haack-Sørensen, M., Juhl, M., Follin, B., Harary Søndergaard, R., Kirchhoff, M., Kasstrup, J., & Ekblond, A. (2018). Development of large-scale manufacturing of adipose-derived stromal cells for clinical applications using bioreactors and human platelet lysate. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 78(4), 293–300.
- [21] Siddiquee, K. & Sha, M. (2014). Large-scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells in BioBLU® 5c Single-use Vessels. Eppendorf Incorporated.
- [22] Wall, M. E., Bernacki, S. H., & Lobo, E. G. (2007). Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 13(6), 1291–1298.
- [23] Liu, J., Ding, Y., Liu, Z., & Liang, X. (2020). Senescence in Mesenchymal Stem Cells: Functional Alterations, Molecular Mechanisms, and Rejuvenation Strategies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(258), 1-17.
- [24] Maillot, C., Sion, C., De Isla, N., Toye, D., & Olmos, E. (2021). Quality by design to define critical process parameters for mesenchymal stem cell expansion. *Biotechnology Advances*, 50(107765).
- [25] Lipsitz, Y. Y., Timmins, N. E., & Zandstra, P. W. (2016). Quality cell therapy manufacturing by design. *Nature Biotechnology*, 34(4), 393–400.
- [26] De Almeida Fuzeta, M., de Matos Branco, A. D., Fernandes-Platzgummer, A., da Silva, C. L., & Cabral, J. M. S. (2019). Addressing the Manufacturing Challenges of Cell-Based

- Therapies. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 171, 225–278.
- [27] Olson, K. A., Schell, J. C., & Rutter, J. (2016). Pyruvate and Metabolic Flexibility: Illuminating a path toward selective cancer therapies The Dynamic and Flexible Metabolic Network HHS Public Access. *Trends Biochem Sci*, 41(3), 219–230.
- [28] Woolf, E. C., & Scheck, A. C. (2015). The Ketogenic Diet for the Adjuvant Treatment of Malignant Brain Tumors. En *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease: Prevention and Therapy*, pp. 125–135.
- [29] Shyh-Chang, N., & Ng, H.-H. (2017). The metabolic programming of stem cells. *Genes & Development*, 31(4), 336–346.
- [30] Tanosaki, S., Tohyama, S., Kishino, Y., Fujita, J., & Fukuda, K. (2021). Metabolism of human pluripotent stem cells and differentiated cells for regenerative therapy: a focus on cardiomyocytes. *Inflammation and Regeneration*, 41(1), 1-9.
- [31] Tohyama, S., Fujita, J., Hishiki, T., Matsuura, T., Hattori, F., Ohno, R., Fukuda, K. (2016). Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metabolism*, 23(4), 663–674.
- [32] Yuan, X., Logan, T. M., & Ma, T. (2019). Metabolism in Human Mesenchymal Stromal Cells: A Missing Link Between hMSC Biomanufacturing and Therapy? *Frontiers in Immunology*, 10(977), 1-11.
- [33] Salazar-Noratto, G. E., Luo, G., Denoed, C., Padrona, M., Moya, A., Bensidhoum, M., Petite, H. (2019). Understanding and leveraging cell metabolism to Enhance Mesenchymal Stem Cell Transplantation Survival in Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *STEM CELLS*, 38, 22-33.
- [34] Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.
- [35] Lefevre, C., Panthu, B., Naville, D., Guibert, S., Pinteur, C., Elena-Herrmann, B., Mey, A. (2019). Metabolic Phenotyping of Adipose-Derived Stem Cells Reveals a Unique Signature and Intrinsic Differences between Fat Pads. *Stem Cells International*, 2019, 1–16.
- [36] Zhang, J., Khvorostov, I., Hong, J. S., Oktay, Y., Vergnes, L., Nuebel, E., Teitell, M. A. (2011). UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells. *The EMBO Journal*, 30, 4860–4873.
- [37] Vozza, A., Parisi, G., De Leonardis, F., Lasorsa, F. M., Castegna, A., Amorese, D., Fiermonte, G. (2014). UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 960–965.
- [38] Intlekofer, A. M., & Finley, L. W. S. (2019). Metabolic signatures of cancer cells and stem cells. *Nature Metabolism*, 1(2), 177–188.
- [39] Xiao, D., Zeng, L., Yao, K., Kong, X., Wu, G., & Yin, Y. (2016). The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications. *Amino Acids*, 48(9), 2067–2080.
- [40] Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG.

- (1993). Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *The Journal of biological chemistry*, 268(21), 15329–15332.
- [41] Zhou, T., Yang, Y., Chen, Q., & Xie, L. (2019). Glutamine Metabolism Is Essential for Stemness of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Bone Homeostasis. *Stem Cells International*, 2019, 1–13.
- [42] Tsogtbaatar, E., Landin, C., Minter-Dykhouse, K., & Folmes, C. D. L. (2020). Energy Metabolism Regulates Stem Cell Pluripotency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(87), 1-16.
- [43] Rigaud, V. O. C., Hoy, R., Mohsin, S., & Khan, M. (2020). Stem Cell Metabolism: Powering Cell-Based Therapeutics. *Cells*, 9(11), 1-17.
- [44] Chandel, N. S., Jasper, H., Ho, T. T., & Passegué, E. (2016). Metabolic regulation of stem cell function in tissue homeostasis and organismal ageing. *Nature Cell Biology*, 18(8), 823–832.
- [45] Barthez, M., Song, Z., Wang, C. L., & Chen, D. (2020). Stem Cell Metabolism and Diet. *Current Stem Cell Reports*, 6(4), 119–125.
- [46] Prochownik, E. V., & Wang, H. (2021). The Metabolic Fates of Pyruvate in Normal and Neoplastic Cells. *Cells*, 10(4), 1-36.
- [47] Jeong, J. Y., Jeoung, N. H., Park, K.-G., & Lee, I.-K. (2012). Transcriptional Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase. *Diabetes & Metabolism Journal*, 36(5), 328-335.
- [48] Roxburgh, J., Metcalfe, A. D., & Martin, Y. H. (2015). The effect of medium selection on adipose-derived stem cell expansion and differentiation: implications for application in regenerative medicine. *Cytotechnology*, 68(4), 957–967.
- [49] Jung, S., Panchalingam, K. M., Rosenberg, L., & Behie, L. A. (2012). Ex Vivo Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells in Defined Serum-Free Media. *Stem Cells International*, 2012, 1–21.
- [50] Dulbecco, R., & Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8(3), 396–397.
- [51] Cimino, M., Gonçalves, R. M., Barrias, C. C., & Martins, M. C. L. (2017). Xeno-Free Strategies for Safe Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell Expansion: Supplements and Coatings. *Stem Cells International*, 2017, 1–13.
- [52] Eagle, H. (1959). Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures. *Science*, 130(3373), 432–437.
- [53] ThermoFisher. (sin fecha). 11885 - DMEM, low glucose, pyruvate. [en línea] <<https://www.thermofisher.com/cl/es/home/technical-resources/media-formulation.48.html>> [consulta: 10 de noviembre, 2021].
- [54] ThermoFisher. (sin fecha). 52100 - DMEM, powder, high glucose. [en línea] <<https://www.thermofisher.com/cl/es/home/technical-resources/media-formulation.186.html>> [consulta: 10 de noviembre, 2021].
- [55] Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Labome MASTER METHODS* 3: 175.

- [56] Barezai, J., Petry, F., Zitzmann, J., Czermak, P., & Salzig, D. (2020). Bioprocess Development for Human Mesenchymal Stem Cell Therapy Products. En *New Advances on Fermentation Processes*, pp. 1-25.
- [57] Ikebe, C., & Suzuki, K. (2014). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *BioMed Research International*, 2014, 1–11.
- [58] Iscove, N. N. (1978). Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 147(3), 923–933.
- [59] ThermoFisher. (sin fecha). 12440 - IMDM. [en línea] <<https://www.thermofisher.com/cl/es/home/technical-resources/media-formulation.76.html>> [consulta: 10 de noviembre, 2021].
- [60] Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), 99–117.
- [61] Ham, R. G. (1965). CLONAL GROWTH OF MAMMALIAN CELLS IN A CHEMICALLY DEFINED, SYNTHETIC MEDIUM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 53(2), 288–293.
- [62] ThermoFisher. (sin fecha). 21700 - Ham's F-12, powder. [en línea] <<https://www.thermofisher.com/cl/es/home/technical-resources/media-formulation.66.html>> [consulta: 10 de noviembre, 2021].
- [63] ThermoFisher. (sin fecha). 11320 - DMEM/F-12. [en línea] <<https://www.thermofisher.com/cl/es/home/technical-resources/media-formulation.55.html>> [consulta: 10 de noviembre, 2021].
- [64] STANNERS, C. P., ELICEIRI, G. L., & GREEN, H. (1971). Two Types of Ribosome in Mouse–Hamster Hybrid Cells. *Nature New Biology*, 230(10), 52–54.
- [65] ThermoFisher. (sin fecha). 11900 - MEM alpha, nucleosides, powder. [en línea] <<https://www.thermofisher.com/cl/es/home/technical-resources/media-formulation.97.html>> [consulta: 10 de noviembre, 2021].
- [66] ThermoFisher. (sin fecha). StemPro™ MSC SFM XenoFree. [en línea] <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/cl/es/A1067501>> [consulta: 10 de noviembre, 2021].
- [67] Lindroos, B., Boucher, S., Chase, L., Kuokkanen, H., Huhtala, H., Haataja, R., Miettinen, S. (2009). Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytotherapy*, 11(7), 958–972.
- [68] León, L., Gerdtzen, Z. (2019). Cultivo en suspensión de células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo para terapia celular. Memoria para optar al título de Ingeniera Civil en Biotecnología. Universidad de Chile, Chile.
- [69] Yin M, Zhang Y, Yu H & Li X. (2021). Role of Hyperglycemia in the Senescence of Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(665412), 1-11.
- [70] Elseberg, C., Leber, J., Weidner, T., & Czermak, P. (2017). The Challenge of Human Mesenchymal Stromal Cell Expansion: Current and Prospective Answers. *New Insights into Cell Culture Technology*, IntechOpen.

- [71] Jossen, V., Pörtner, R., Kaiser, S. C., Kraume, M., Eibl, D., & Eibl, R. (2014). Mass Production of Mesenchymal Stem Cells — Impact of Bioreactor Design and Flow Conditions on Proliferation and Differentiation. *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine, IntechOpen*.
- [72] Gerdtzen, Z. P. (2017). Medium Design, Culture Management, and the PAT Initiative. En *Applied Bioengineering*, pp. 383–416.
- [73] Shaban, S., El-Husseney, M. W. A., Abushouk, A. I., Salem, A. M. A., Mamdouh, M., & Abdel-Daim, M. M. (2017). Effects of Antioxidant Supplements on the Survival and Differentiation of Stem Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(5032102), 1–16.
- [74] Long, L. H., & Halliwell, B. (2009). Artefacts in cell culture: Pyruvate as a scavenger of hydrogen peroxide generated by ascorbate or epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 700–704.
- [75] Panahi, M., Rahimi, B., Rahimi, G., Yew Low, T., Saraygord-Afshari, N., & Alizadeh, E. (2020). Cytoprotective effects of antioxidant supplementation on mesenchymal stem cell therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 6462–6495.
- [76] Liu, Y., & Ma, T. (2014). Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application. *Biotechnology Progress*, 31(2), 468–481.
- [77] Yang, C.-D., Chuang, S.-C., Cheng, T.-L., Lee, M.-J., Chen, H.-T., Lin, S.-Y., Chen, C.-H. (2021). An Intermediate Concentration of Calcium with Antioxidant Supplement in Culture Medium Enhances Proliferation and Decreases the Aging of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1-17.
- [78] McKee, C., & Chaudhry, G. R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 62–77.
- [79] Tsai, A.-C., Jeske, R., Chen, X., Yuan, X., & Li, Y. (2020). Influence of Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Therapeutic Potency: From Planar Culture to Microcarriers. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(640), 1-22.
- [80] Tsai, A.-C., & Pacak, C. A. (2021). Bioprocessing of Human Mesenchymal Stem Cells: From Planar Culture to Microcarrier-Based Bioreactors. *Bioengineering*, 8(7), 1-22.
- [81] Chen, A. K.-L., Reuveny, S., & Oh, S. K. W. (2013). Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements and future direction. *Biotechnology Advances*, 31(7), 1032–1046.
- [82] Merten, O.-W. (2014). Advances in cell culture: anchorage dependence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1661).
- [83] Naqvi, S. M., & McNamara, L. M. (2020). Stem Cell Mechanobiology and the Role of Biomaterials in Governing Mechanotransduction and Matrix Production for Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(597661), 1-27.
- [84] Romani, P., Valcarcel-Jimenez, L., Frezza, C., & Dupont, S. (2020). Crosstalk between mechanotransduction and metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22, 22–38.
- [85] Rivera-Ordaz, A., Peli, V., Manzini, P. (2021). Critical Analysis of cGMP Large-Scale Expansion Process in Bioreactors of Human Induced Pluripotent Stem Cells in the Frame-

- work of Quality by Design. *BioDrugs* 35, 693–714.
- [86] Ma, T., Tsai, A.-C., & Liu, Y. (2016). Biomanufacturing of human mesenchymal stem cells in cell therapy: Influence of microenvironment on scalable expansion in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 108, 44–50.
- [87] Hazrati, A., KMalekpour, K., Soudi, S., Mahmoud Hashemi S. (2022). Mesenchymal stromal/stem cells spheroid culture effect on the therapeutic efficacy of these cells and their exosomes: A new strategy to overcome cell therapy limitations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 152, 1-13.
- [88] Cesarz, Z., & Tamama, K. (2016). Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016, 1–11.
- [89] Petry, F., & Salzig, D. (2021). Impact of Bioreactor Geometry on Mesenchymal Stem Cell Production in Stirred-Tank Bioreactors. *Chemie Ingenieur Technik*, 93(10), 1–19.
- [90] Al-Ani, A., Toms, D., Kondro, D., Thundathil, J., Yu, Y., & Ungrin, M. (2018). Oxygenation in cell culture: Critical parameters for reproducibility are routinely not reported. *PLOS ONE*, 13(10), 1-13.
- [91] Zhao, F., Pathi, P., Grayson, W., Xing, Q., Locke, B. R., & Ma, T. (2008). Effects of Oxygen Transport on 3-D Human Mesenchymal Stem Cell Metabolic Activity in Perfusion and Static Cultures: Experiments and Mathematical Model. *Biotechnology Progress*, 21(4), 1269–1280.
- [92] Pias S. C. (2020). Pathways of Oxygen Diffusion in Cells and Tissues : Hydrophobic Channeling via Networked Lipids. *Advances in experimental medicine and biology*, 1232, 183–190.
- [93] Goda, N., & Kanai, M. (2012). Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. *International Journal of Hematology*, 95(5), 457–463.
- [94] Ma, T., Grayson, W. L., Fröhlich, M., & Vunjak-Novakovic, G. (2009). Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnology Progress*, 25(1), 32–42.
- [95] Choi, J. R., Yong, K. W., & Wan Safwani, W. K. Z. (2017). Effect of hypoxia on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its potential clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(14), 2587–2600.
- [96] Navas, L. E., & Carnero, A. (2021). NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1).
- [97] Fotia, C., Massa, A., Boriani, F., Baldini, N., & Granchi, D. (2014). Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*, 67(6), 1073–1084.
- [98] Mischen, B. T., Follmar, K. E., Moyer, K. E., Buehrer, B., Olbrich, K. C., Levin, L. S., Erdmann, D. (2008). Metabolic and Functional Characterization of Human Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Engineering. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 122(3), 725–738.
- [99] Zhang, X., Wen, Y., & Yang, S. T. (2011). Modes of Culture/Animal Cells. En *Comprehensive Biotechnology*, pp. 285–302.
- [100] Schop, D., Janssen, F. W., van Rijn, L. D. S., Fernandes, H., Bloem, R. M., de Bruijn,

- J. D., & van Dijkhuizen-Radersma, R. (2009). Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, 15(8), 1877–1886.
- [101] Perez-Ramirez, C. A., & Christofk, H. R. (2021). Challenges in Studying Stem Cell Metabolism. *Cell Stem Cell*, 28(3), 409–423.
- [102] Lin, R. Y., Vera, J. C., Chaganti, R. S. K., & Golde, D. W. (1998). Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 28959–28965.
- [103] Zhang, B., Jin, Q., Xu, L., Li, N., Meng, Y., Chang, S., Ye, S. (2020). Cooperative transport mechanism of human monocarboxylate transporter 2. *Nature Communications*, 11(1).
- [104] Garcia, C. K., Brown, M. S., Pathak, R. K., & Goldstein, J. L. (1995). cDNA Cloning of MCT2, a Second Monocarboxylate Transporter Expressed in Different Cells than MCT1. *Journal of Biological Chemistry*, 270(4), 1843–1849.
- [105] Zhou F-Q. (2021). NAD⁺, Senolytics, or Pyruvate for Healthy Aging? Nutrition and Metabolic Insights. *Sage Journals*, 14, 1-8.
- [106] Shyh-Chang, N., Daley, G. Q., & Cantley, L. C. (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development*, 140(12), 2535–2547.
- [107] Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.
- [108] Song, C., Xu, F., Ren, Z., Zhang, Y., Meng, Y., Yang, Y., Chen, G. (2019). Elevated Exogenous Pyruvate Potentiates Mesodermal Differentiation through Metabolic Modulation and AMPK/mTOR Pathway in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 13, 1-14.
- [109] Ramos-Ibeas, P., Barandalla, M., Colleoni, S., & Lazzari, G. (2017). Pyruvate antioxidant roles in human fibroblasts and embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 429(1-2), 137–150.
- [110] Pei, F., Jiang, J., Bai, S., Cao, H., Tian, L., Zhao, Y., Ma, Y. (2017). Chemical-defined and albumin-free generation of human atrial and ventricular myocytes from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 19, 94–103.
- [111] Covarrubias, A. J., Perrone, R., Grozio, A., & Verdin, E. (2020). NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22, 119–141.
- [112] Yuan, X., Liu, Y., Bijonowski, B. M., Tsai, A.-C., Fu, Q., Logan, T. M., ... Li, Y. (2020). NAD⁺/NADH redox alterations reconfigure metabolism and rejuvenate senescent human mesenchymal stem cells in vitro. *Communications Biology*, 3(1).
- [113] Zhu, Y., Liu, J., Park, J., Rai, P., & Zhai, R. G. (2019). Subcellular compartmentalization of NAD⁺ and its role in cancer: A sereNADE of metabolic melodies. *Pharmacology & Therapeutics*, 200, 27–41.
- [114] Jeske R, Yuan X, Fu Q, Bunnell BA, Logan TM & Li Y. (2021). In Vitro Culture Expansion Shifts the Immune Phenotype of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem

- Cells. *Frontiers in Immunology*, 12(621744), 1-16.
- [115] Khorraminejad-Shirazi, M., Sani, M., Talaei-Khozani, T., Dorvash, M., Mirzaei, M., Faghihi, M. A., Attar, A. (2020). AICAR and nicotinamide treatment synergistically augment the proliferation and attenuate senescence-associated changes in mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 1-17.
- [116] Valvona, C. J., Fillmore, H. L., Nunn, P. B., & Pilkington, G. J. (2015). The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathology*, 26(1), 3–17.
- [117] Meng, Y., Ren, Z., Xu, F., Zhou, X., Song, C., Wang, V. Y.-F., Chen, G. (2018). Nicotinamide Promotes Cell Survival and Differentiation as Kinase Inhibitor in Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 11, 1-10.
- [118] Okabe, K., Yaku, K., Tobe, K., & Nakagawa, T. (2019). Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders. *Journal of Biomedical Science*, 26(1).
- [119] PeledYair T. & Steinhardt Y. (2013). Culturing of mesenchymal stem cells with FGF4 and nicotinamide. *US10047345B2*: Estados Unidos.
- [120] Ratcliffe, E., Hourd, P., Guijarro-Leach, J., Rayment, E., Williams, D. J., & Thomas, R. J. (2013). Application of response surface methodology to maximize the productivity of scalable automated human embryonic stem cell manufacture. *Regenerative Medicine*, 8(1), 39–48.
- [121] Sarabia, L. A., & Ortiz, M. C. (2009). Response Surface Methodology. En *Comprehensive Chemometrics*, 345–390.
- [122] Mandenius, C.-F. (2016). Design-of-Experiments for Development and Optimization of Bioreactor Media. En *Bioreactors*, 421–452.
- [123] Badenes, S. M., Fernandes, T. G., Cordeiro, C. S. M., Boucher, S., Kuninger, D., Vemuri, M. C., ... Cabral, J. M. S. (2016). Defined Essential 8™ Medium and Vitronectin Efficiently Support Scalable Xeno-Free Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cells in Stirred Microcarrier Culture Systems. *PLOS ONE*, 11(3).
- [124] Cui, Yan Chao; Qiu, Yu Sheng; Wu, Qiong; Bu, Gang; Teh, Seah Wei; He, Guo Zhong; Mok, Pooi Ling; Samrot, Antony V. (2020). Hypoxic-Mediated Oxidative Stress Condition and Hydroxyapatite-Inducing Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: A Mathematical Modeling Study. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 16(6), 910-921.
- [125] Murphy, K. C., Whitehead, J., Falahee, P. C., Zhou, D., Simon, S. I., & Leach, J. K. (2017). Multifactorial Experimental Design to Optimize the Anti-Inflammatory and Proangiogenic Potential of Mesenchymal Stem Cell Spheroids. *STEM CELLS*, 35(6), 1493–1504.
- [126] Kwon, S.-S., Kim, H., Shin, S.-J., & Lee, S. Y. (2020). Optimization of tenocyte lineage-related factors from tonsil-derived mesenchymal stem cells using response surface methodology. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 15(1).
- [127] Branco, A., Bucar, S., Moura-Sampaio, J., Lilaia, C., Cabral, J. M. S., Fernandes-Platzgummer, A., & Lobato da Silva, C. (2020). Tailored Cytokine Optimization for ex vivo Culture Platforms Targeting the Expansion of Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(573282), 1-21.

- [128] Marinho, P. A., Chailangkarn, T., & Muotri, A. R. (2015). Systematic optimization of human pluripotent stem cells media using Design of Experiments. *Scientific Reports*, 5(1).
- [129] Esmaceli E, Malaie-Balasi Z, Kabiri M, Khojasteh A, Mohamadyar-Toupkanlou F, Sadeghzadeh N, Zarei-Behjani Z, Hosseinzadeh S. (2021). Optimization of Nanoclay/Polycrylonitrile Scaffold Using Response Surface Method for Bone Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *ASAIO Journal*, 67(10), 1176-1185.
- [130] Pulido Gutierrez Humberto, Salazar de la Vara Roman. (2012). Análisis y diseño de experimentos. 3° ed. McGraw-Hill, México.
- [131] Lenth Russell. (2020). Response-Surface Methods in R, Using rsm. [en línea] <<https://cran.r-project.org/web/packages/rsm/vignettes/rsm.pdf>> [consulta: 06 de octubre, 2021].
- [132] Zhang, X., Semon, J. A., Zhang, S., Strong, A. L., Scruggs, B. A., Gimble, J. M., & Bunnell, B. A. (2013). Characterization of adipose-derived stromal/stem cells from the twitcher mouse model of krabbe disease. *BMC Cell Biology*, 14(1), 1-11.
- [133] Jossen, V., Muoio, F., Panella, S., Harder, Y., Tallone, T., & Eibl, R. (2020). An Approach towards a GMP Compliant In-Vitro Expansion of Human Adipose Stem Cells for Autologous Therapies. *Bioengineering*, 7(3), 1-33.
- [134] Petiot, E., Guedon, E., Blanchard, F., Gény, C., Pinton, H., & Marc, A. (2010). Kinetic characterization of vero cell metabolism in a serum-free batch culture process. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(1), 143–153.
- [135] Bahat, A., & Gross, A. (2019). Mitochondria Plasticity in Cell Fate Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(38), 13852–13863.
- [136] Sutendra, G., Kinnaird, A., Dromparis, P., Paulin, R., Stenson, T. H., Haromy, A., Michelakis, E. D. (2014). A Nuclear Pyruvate Dehydrogenase Complex Is Important for the Generation of Acetyl-CoA and Histone Acetylation. *Cell*, 158(1), 84–97.
- [137] Stein, L. R., & Imai, S. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(9), 420–428.
- [138] Chen, H., Liu, X., Zhu, W., Chen, H., Hu, X., Jiang, Z., Wang, J. (2014). SIRT1 ameliorates age-related senescence of mesenchymal stem cells via modulating telomere shelterin. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(103), 1-12.
- [139] Potocar, U., Hudoklin, S., Kreft, M. E., Završnik, J., Božikov, K., & Fröhlich, M. (2016). Adipose-Derived Stem Cells Respond to Increased Osmolarities. *PLOS ONE*, 11(10).
- [140] Wang H., Sun Y., Pi C., Yu X., Gao X., Zhang C., Sun H., Zhang H., Shi Y., He X. (2022). Nicotinamide Mononucleotide Supplementation Improves Mitochondrial Dysfunction and Rescues Cellular Senescence by NAD⁺/Sirt3 Pathway in Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23).
- [141] Weng Z., Wang Y., Ouchi T., Liu H., Qiao X., Wu C., Zhao Z., Li L., Li B. (2022). Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. *Stem Cells Translational Medicine*, 11(4), 356–371.
- [142] MA T., Yuan X., Logan T. (2021). Cell expansion methods for preventing cell senescence and preserving the therapeutic potency of human mesenchymal stem cells. *US202062961281P*: Estados Unidos.

- [143] Luengo, A., Li, Z., Gui, D. Y., Sullivan, L. B., Zagorulya, M., Do, B. T., Vander Heiden, M. G. (2021). Increased demand for NAD⁺ relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Molecular Cell*, 81(4), 691–707.
- [144] Xiao, W., Wang, R.-S., Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2018). NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(3), 251–272.
- [145] Talaiezhadeh, A., Shahriari, A., Tabandeh, M., Fathizadeh, P., & Mansouri, S. (2015). Kinetic characterization of lactate dehydrogenase in normal and malignant human breast tissues. *Cancer Cell International*, 15(1).
- [146] Lees, J. G., Gardner, D. K., Harvey, A. J. (2020). Nicotinamide adenine dinucleotide induces a bivalent metabolism and maintains pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem cells*, 38(5), 624–638.
- [147] Toloudi, M., Ioannou, E., Chatziioannou, M., Apostolou, P., Kiritsis, C., Manta, S., Komiotis, D., Papisotiriou, I. (2014). Comparison of the Growth Curves of Cancer Cells and Cancer Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 9(2), 112–116.
- [148] Promega. (sin fecha). Lactate-GloTM Assay: Technical manual.
- [149] Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, 32(4), 266–277.
- [150] Charlebois, D. (2018). Modeling cell population dynamics. *In Silico Biology*, 13(1-2), 21–39.
- [151] Gumbiner, B. M., & Kim, N.-G. (2014). The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *Journal of Cell Science*, 127(4), 709–717.
- [152] Ibar, C., & Irvine, K. D. (2020). Integration of Hippo-YAP Signaling with Metabolism. *Developmental Cell*, 54(2), 256–267.
- [153] Rafiq, Q. A., Brosnan, K. M., Coopman, K., Nienow, A. W., & Hewitt, C. J. (2013). Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnology Letters*, 35(8), 1233–1245.
- [154] Matthew S., & Nathaniel W. (2010). Strategy to reduce lactic acid production and control PH in animal cell culture. *US8470552B2*: Estados Unidos.
- [155] Kierans, S. J., & Taylor, C. T. (2021). Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *The Journal of physiology*, 599(1), 23–37.
- [156] Nuschke, A., Rodrigues, M., Wells, A. W., Sylakowski, K., & Wells, A. (2016). Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1).
- [157] Luo G., Wosinski P., Salazar-Noratto G., Bensidhoum M., Bizios R., Marashi S., Potier E., Sheng P., & Petite H. (2022). Glucose metabolism: optimizing regenerative functionalities of mesenchymal stromal cells post-implantation. *Tissue Engineering Part B: Reviews*.
- [158] Park, H. S., Kim, J. H., Sun, B. K., Song, S. U., Suh, W., & Sung, J.-H. (2016). Hypoxia induces glucose uptake and metabolism of adipose-derived stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 14(5), 4706–4714.

- [159] Gilman, J., Walls, L., Bandiera, L., & Menolascina, F. (2021). Statistical Design of Experiments for Synthetic Biology. *ACS Synthetic Biology*, 10(1), 1–18.
- [160] Möller, J., Kuchemüller, K. B., Steinmetz, T., Koopmann, K. S., & Pörtner, R. (2019). Model-assisted Design of Experiments as a concept for knowledge-based bioprocess development. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(5), 867–882.
- [161] Choi, K.-M., Yoon, H.-H., Seo, Y.-K., Song, K.-Y., Kwon, S.-Y., Lee, H.-S., . . . Park, J.-K. (2007). Effect of essential and nonessential amino acid compositions on the in vitro behavior of human mesenchymal stem cells. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(6), 1058–1063.
- [162] Möller, J., & Pörtner, R. (2017). Model-Based Design of Process Strategies for Cell Culture Bioprocesses: State of the Art and New Perspectives. *New Insights into Cell Culture Technology, IntechOpen*.
- [163] Kuchemüller, K.B., Pörtner, R., Möller, J. (2020). Efficient Optimization of Process Strategies with Model-Assisted Design of Experiments. En *Animal Cell Biotechnology. Methods in Molecular Biology*.
- [164] Esteban PP., Patel H., Veraitch F., Khalife R. (2021). Optimization of the nutritional environment for differentiation of human-induced pluripotent stem cells using design of experiments—A proof of concept. *Biotechnol Progress*, 37, 1-15.
- [165] Jara, C., Oyarzun-Ampuero, F., Carrión, F., González-Echeverría, E., Cappelli, C., & Caviedes, P. (2020). Microencapsulation of cellular aggregates composed of differentiated insulin and glucagon-producing cells from human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 12(1).
- [166] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- [167] BUHRING, H.-J., BATTULA, V. L., TREML, S., SCHEWE, B., KANZ, L., & VOGEL, W. (2007). Novel Markers for the Prospective Isolation of Human MSC. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1106(1), 262–271.
- [168] Lv, F.-J., Tuan, R. S., Cheung, K. M. C., & Leung, V. Y. L. (2014). Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*, 32(6), 1408–1419.
- [169] Gojanovich, A. D., Gimenez, M. C., Masone, D., Rodriguez, T. M., Dewey, R. A., Delgui, L. R., Uhart, M. (2018). Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells Handling Protocols. Lipid Droplets and Proteins Double-Staining. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6.
- [170] Lee, J., Lee, C. Y., Park, J.-H., Seo, H.-H., Shin, S., Song, B.-W., . . . Hwang, K.-C. (2020). Differentiation of adipose-derived stem cells into functional chondrocytes by a small molecule that induces Sox9. *Experimental & Molecular Medicine*, 52, 672–681.
- [171] Yamashita, A., Nishikawa, S., & Rancourt, D. E. (2010). Identification of Five Developmental Processes during Chondrogenic Differentiation of Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE*, 5(6).

- [172] Quintana L., I. zur Nieden N., E. Semino C. (2009). Morphogenetic and Regulatory Mechanisms During Developmental Chondrogenesis: New Paradigms for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B*, 15(1): 29-41.
- [173] Hanna, H., Mir, L. M., & Andre, F. M. (2018). In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1).
- [174] Eggerschwiler, B., Canepa, D. D., Pape, H.-C., Casanova, E. A., & Cinelli, P. (2019). Automated digital image quantification of histological staining for the analysis of the trilineage differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1).
- [175] Muoio, F., Panella, S., Jossen, V., Lindner, M., Harder, Y., Müller, M., Tallone, T. (2021). Human Adipose Stem Cells (hASCs) Grown on Biodegradable Microcarriers in Serum- and Xeno-Free Medium Preserve Their Undifferentiated Status. *Journal of Functional Biomaterials*, 12(2).
- [176] Egger, D., Fischer, M., Clementi, A., Ribitsch, V., Hansmann, J., & Kasper, C. (2017). Development and Characterization of a Parallelizable Perfusion Bioreactor for 3D Cell Culture. *Bioengineering*, 4(4).
- [177] Quek, L.-E., Dietmair, S., Krömer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2), 161–171.
- [178] Sha, S., Kuang, B., & Yoon, S. (2021). Characterization of dynamic regulation in Chinese hamster ovary (CHO) cell cultures in the late exponential phase. *Biochemical Engineering Journal*, 167(2021).
- [179] Niklas J, Schräder E, Sandig V, Noll T, Heinzle E. (2011). Quantitative characterization of metabolism and metabolic shifts during growth of the new human cell line AGE1.HN using time resolved metabolic flux analysis. *Bioprocess Biosyst Eng* , 34(5),533-545.
- [180] Assanga, I. (2013). Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 4(4), 60–70.
- [181] Verma, A., Verma, M., & Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. En *Animal Biotechnology*, pp. 269–293.
- [182] Amersham Bioscience. (sin fecha). Microcarrier cell culture: Principles & methods.
- [183] De Bournonville, S., Geris, L., & Kerckhofs, G. (2021). Micro computed tomography with and without contrast enhancement for the characterization of microcarriers in dry and wet state. *Scientific Reports*, 11(1).
- [184] Oyeleye, O. O., Ogundeji, S. T., Ola, S. I., & Omitogun, O. G. (2016). Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 11(2), 6–16.
- [185] Sigma-Aldrich. (sin fecha). FUNDAMENTAL TECHNIQUES IN CELL CULTURE: LABORATORY HANDBOOK. 3° ed. Sigma-Aldrich, Estados Unidos.
- [186] Lykov, A. P., Bondarenko, N. A., Surovtseva, M. A., Kim, I. I., Poveshchenko, O. V., Pokushalov, E. A., & Konenkov, V. I. (2017). Comparative Effects of Platelet-Rich

- Plasma, Platelet Lysate, and Fetal Calf Serum on Mesenchymal Stem Cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 163(6), 757–760.
- [187] Lai, F., Kakudo, N., Morimoto, N., Taketani, S., Hara, T., Ogawa, T., & Kusumoto, K. (2018). Platelet-rich plasma enhances the proliferation of human adipose stem cells through multiple signaling pathways. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1).
- [188] Rafiq, Q. A., Brosnan, K. M., Coopman, K., Nienow, A. W., & Hewitt, C. J. (2013). Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnology Letters*, 35(8), 1233–1245.
- [189] Jossen, V., van den Bos, C., Eibl, R., & Eibl, D. (2018). Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(9), 3981–3994.
- [190] Sigmarsdóttir, Þ., McGarrity, S., Rolfsson, Ó., Yurkovich, J. T., & Sigurjónsson, Ó. E. (2020). Current Status and Future Prospects of Genome-Scale Metabolic Modeling to Optimize the Use of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(239).
- [191] Hassan, R. O., & Faizullah, A. T. (2013). Determination of nicotinamide by stopped-flow injection method in pharmaceutical formulations. *Arabian Journal of Chemistry*, 6(4), 393–400.
- [192] ThermoFisher. (sin fecha). Enzima TrypLE™ Select (1X). [en línea] <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12563011>> [consulta: 10 de noviembre, 2022].
- [193] Jossen, V., Schirmer, C., Mostafa Sindi, D., Eibl, R., Kraume, M., Pörtner, R., & Eibl, D. (2016). Theoretical and Practical Issues That Are Relevant When Scaling Up hMSC Microcarrier Production Processes. *Stem Cells International*, 2016(4760414), 1–15.

Anexos

Anexo A

Composición medio α -MEM

Tabla A.1: Componentes medio de cultivo α -MEM (Gibco™)

Componente	PM (g/mol)	mg/L	mM
Aminoácidos			
Glicina	75	50	0,66667
L-Alanina	89	25	0,2809
L-Arginina	211	105	0,49763
L-Asparagina-H ₂ O	150	50	0,33333
L-Ácido aspártico	133	30	0,22556
L-Clorhidrato de cisteína-H ₂ O	176	100	0,56818
L-Cisteína-2 HCl	313	31	0,09904
L-Ácido glutámico	147	75	0,5102
L-Glutamina	146	292	2
L-Histidina	155	31	0,2
L-Isoleucina	131	52,4	0,4
L-Leucina	131	52,4	0,4
L-Lisina	183	73	0,3989
L-Metionina	149	15	0,10067
L-Fenilalanina	165	32	0,19394
L-Prolina	115	40	0,34783
L-Serina	105	25	0,2381
L-Treonina	119	48	0,40336
L-Triptófano	204	10	0,04902
L-Tirosina	225	52	0,23111
L-Valina	117	46	0,39316
Vitaminas			
Ácido ascórbico	176	50	0,28409
Biotina	244	0,1	0,0041
Cloruro de colina	140	1	0,00714
D-Pantotenato de calcio	477	1	0,00209
Ácido fólico	441	1	0,00227
Niacinamida	122	1	0,0082
Clorhidrato de piridoxal	204	1	0,0049
Riboflavina	376	0,1	0,00266
Clorhidrato de tiamina	337	1	0,00297
Vitamina B12	1355	1,36	0,001
i-Inositol	180	2	0,01111

Tabla A.2: Componentes medio de cultivo α -MEM (Gibco™) (continuación)

Componente	PM (g/mol)	mg/L	mM
Sales inorgánicas			
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	111	200	1,8018
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	120	97,67	0,81392
Cloruro de potasio (KCl)	75	400	5
Cloruro de sodio (NaCl)	58	6800	117
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	138	140	1
Ribonucleósidos			
Adenosina	267	10	0,03745
Citidina	243	10	0,04115
Guanosina	283	10	0,03534
Uridina	244	10	0,04098
Desoxirribonucleósidos			
2'Desoxiadenosina	251	10	0,03984
2'Desoxicitidina HCl	264	11	0,04167
2'Desoxiguanosina	267	10	0,03745
Timidina	242	10	0,04132
Otros			
D-Glucosa	180	1000	5,55556
Ácido lipoico	206	0,2	0,00097
Rojo fenol	376,4	10	0,02657
Piruvato de sodio	110	110	1

Anexo B

Datos citometría de flujo

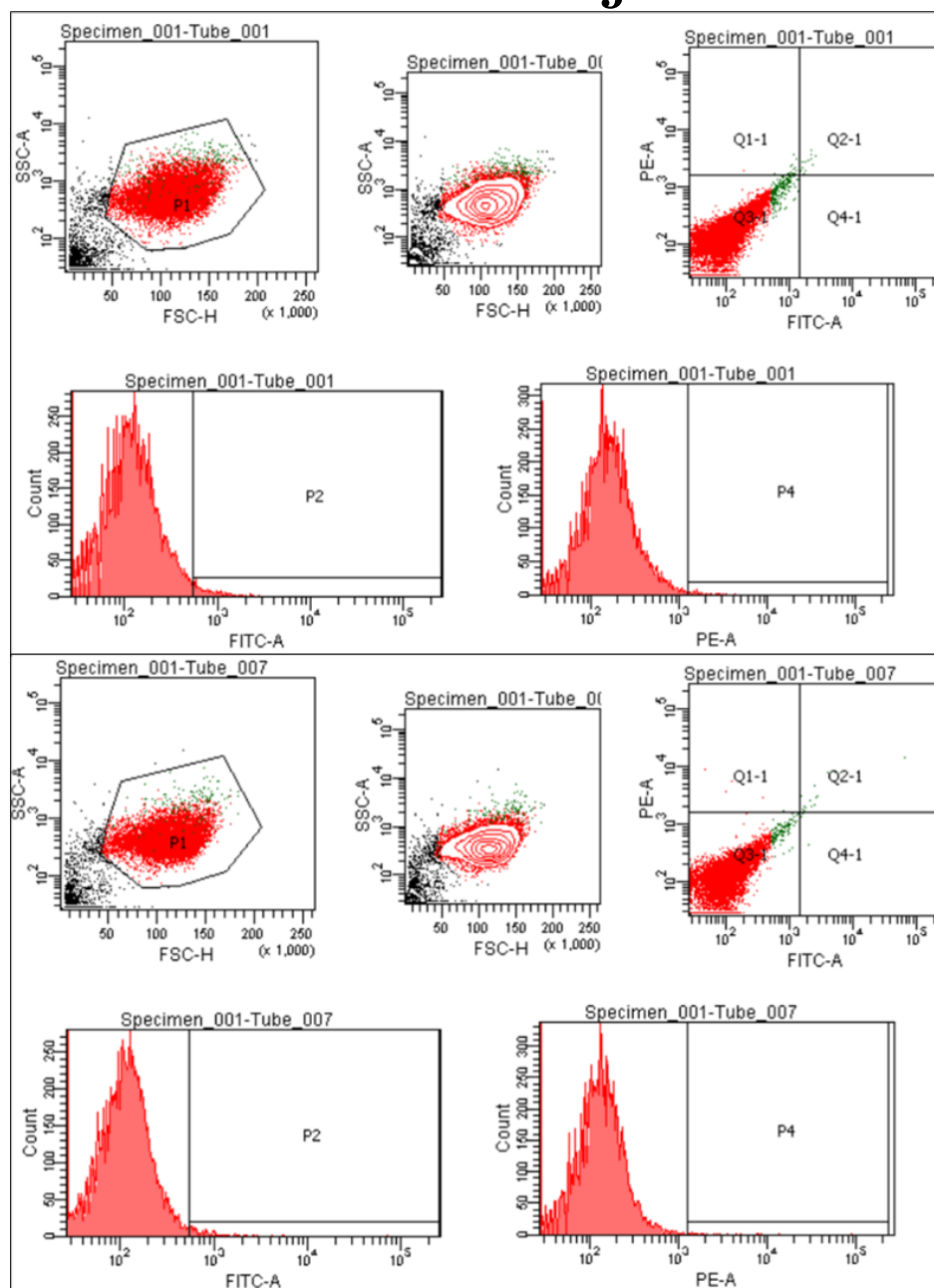


Figura B.1: Histogramas para muestras incubadas con isotipo IgG1. Resultados para muestras de hASC cultivadas en monocapa en medio α -MEM antiOX (arriba) y α -MEM antiOX enriquecido (abajo).

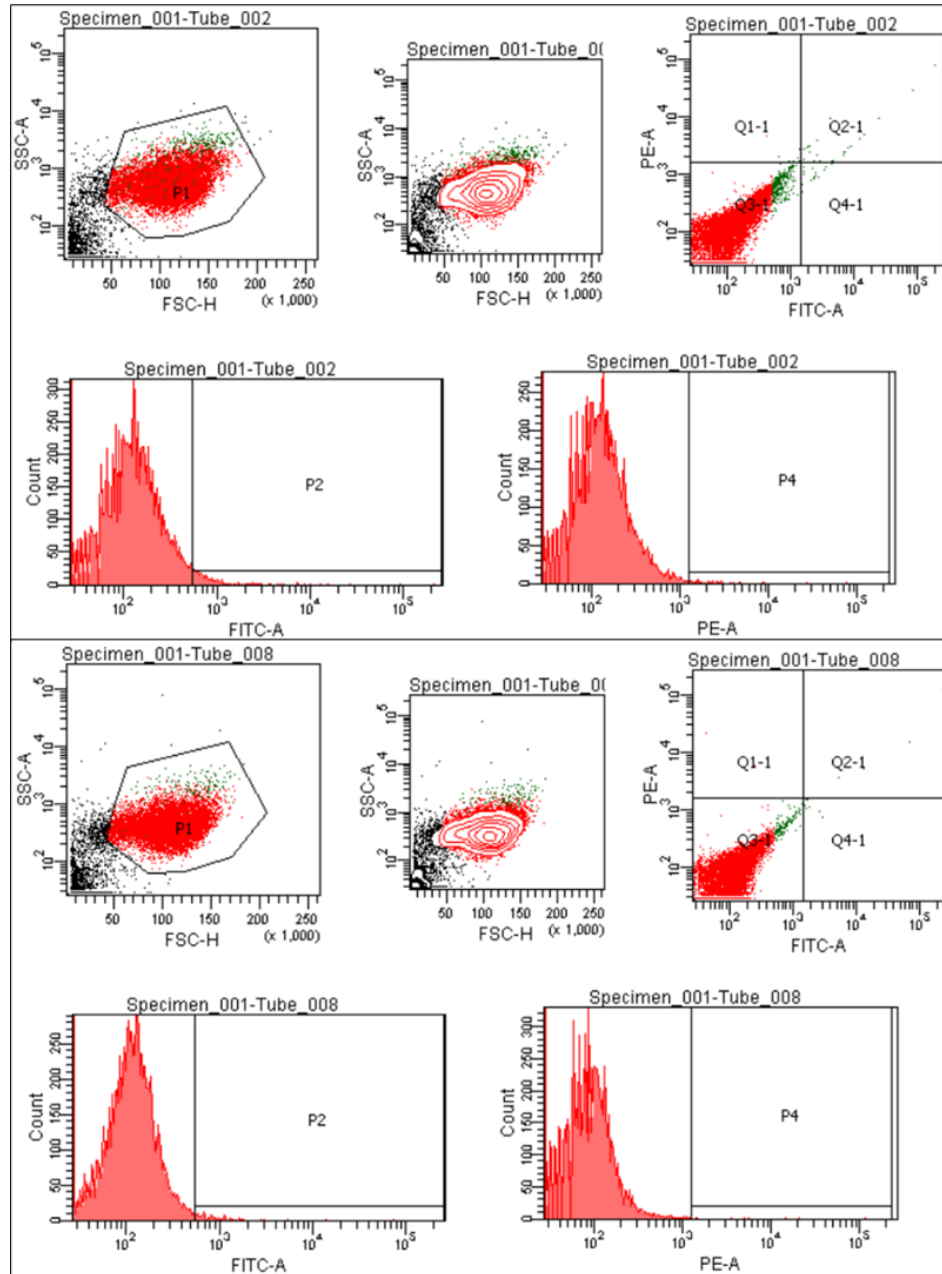


Figura B.2: Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD45 y PE-anti CD34. Resultados para muestras de hASC cultivadas en monocapa en medio α -MEM antiOX (arriba) y α -MEM antiOX enriquecido (abajo).

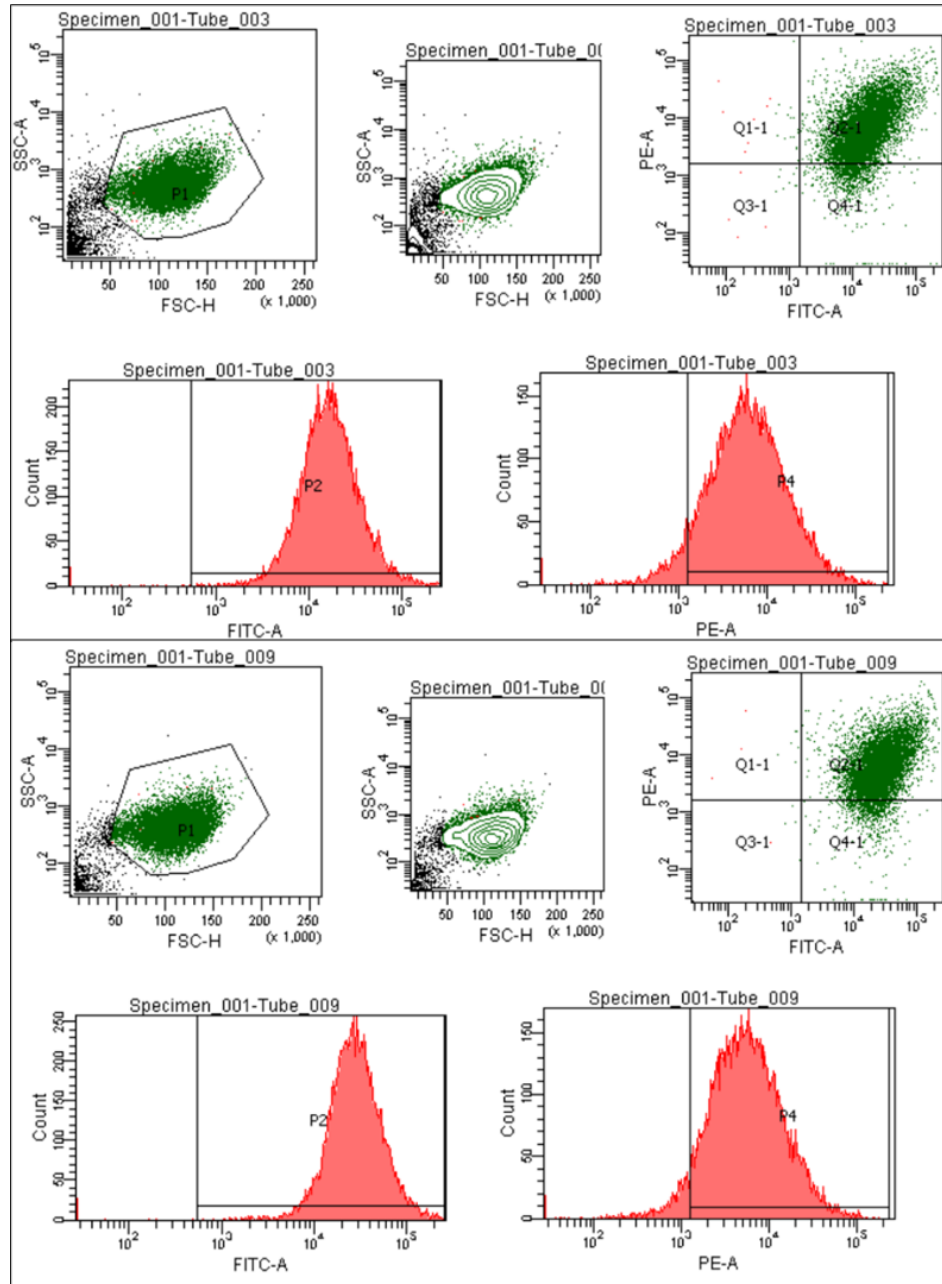


Figura B.3: Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD90 y PE-anti CD105. Resultados para muestras de hASC cultivadas en monocapa en medio α -MEM antiOX (arriba) y α -MEM antiOX enriquecido (abajo).

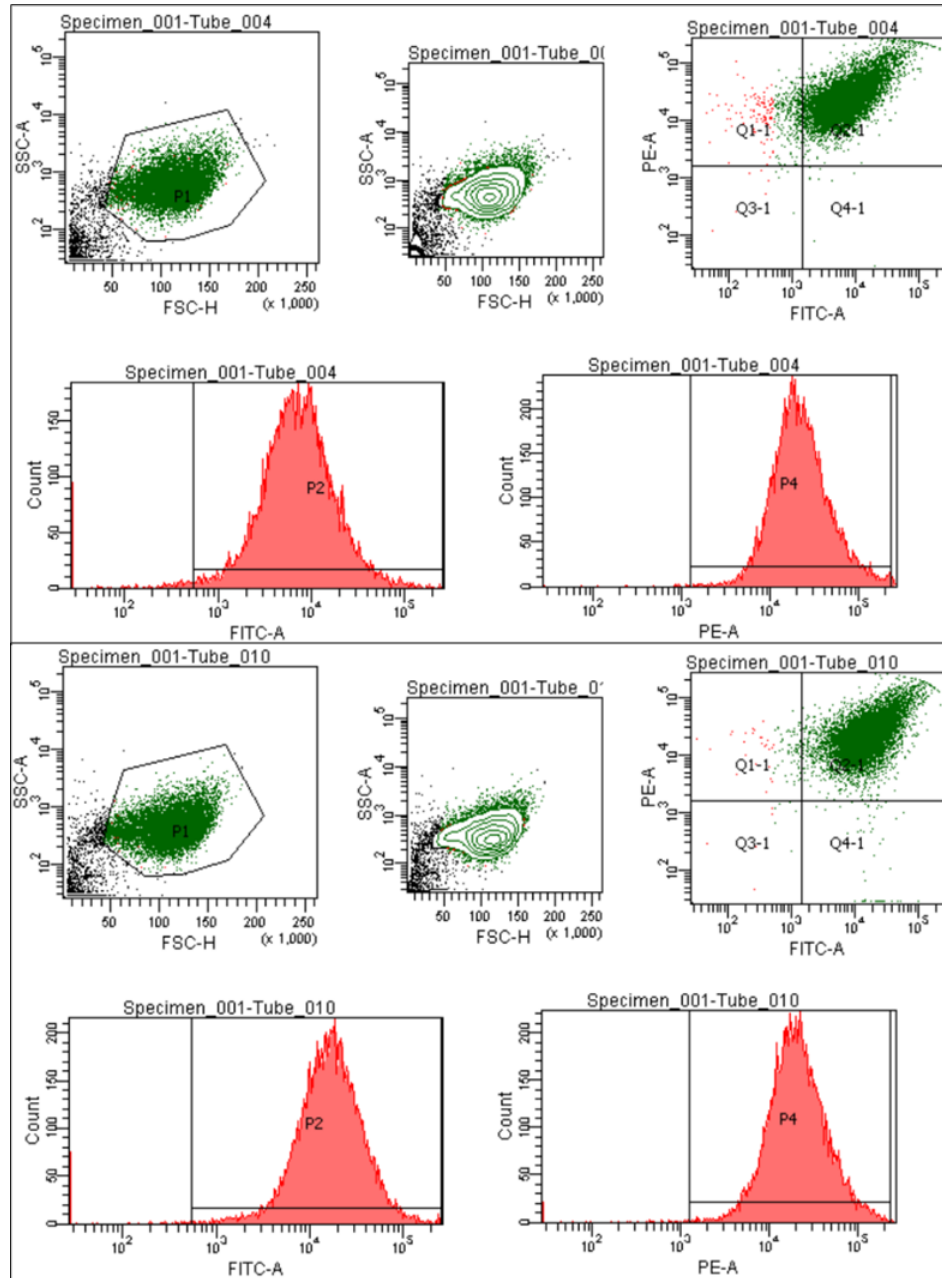


Figura B.4: Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD44 y PE-anti CD73. Resultados para muestras de hASC cultivadas en monocapa en medio α -MEM antiOX (arriba) y α -MEM antiOX enriquecido (abajo).

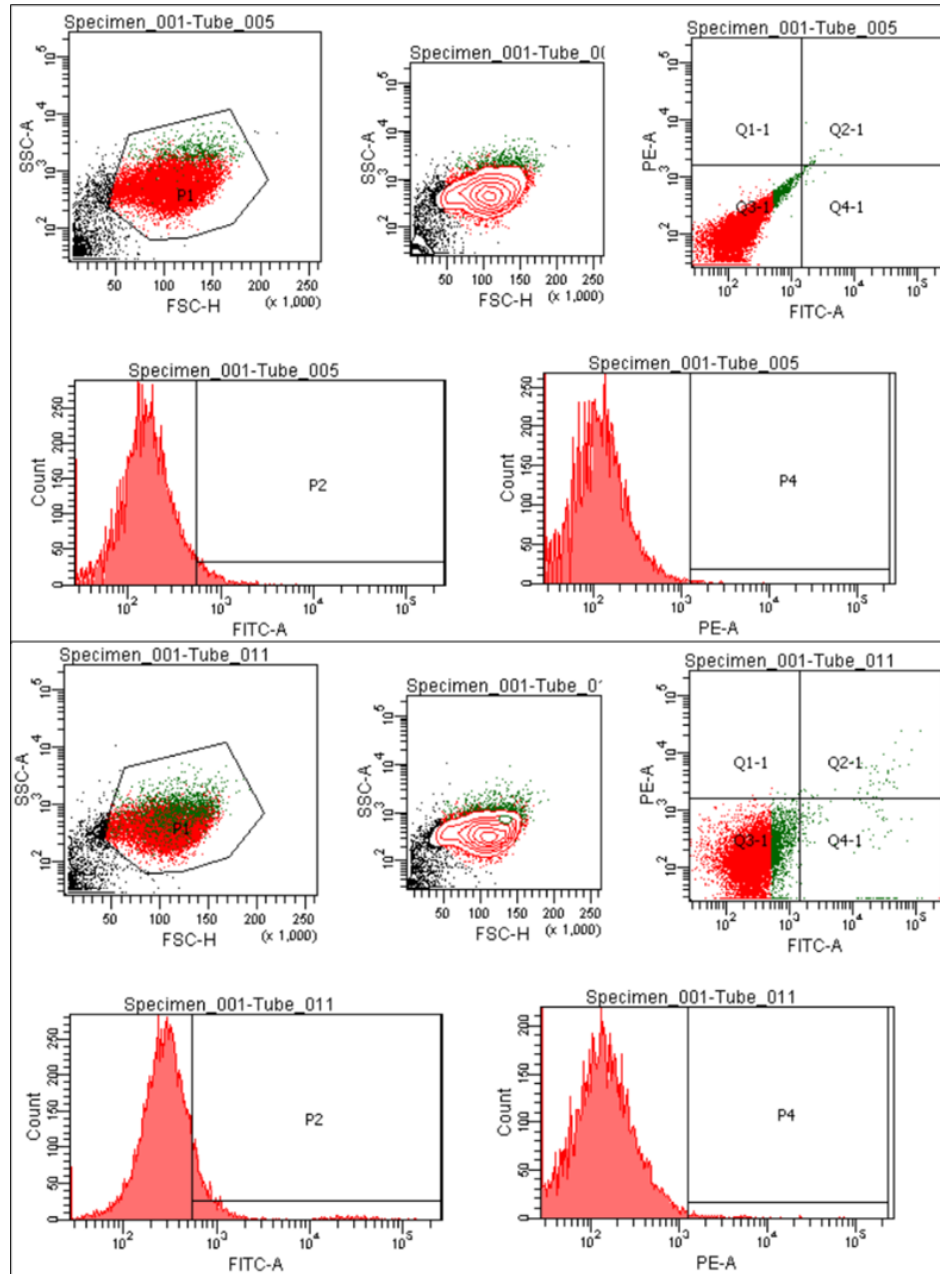


Figura B.5: Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD19 y PE-anti HLA-DR. Resultados para muestras de hASC cultivadas en monocapa en medio α -MEM antiOX (arriba) y α -MEM antiOX enriquecido (abajo).

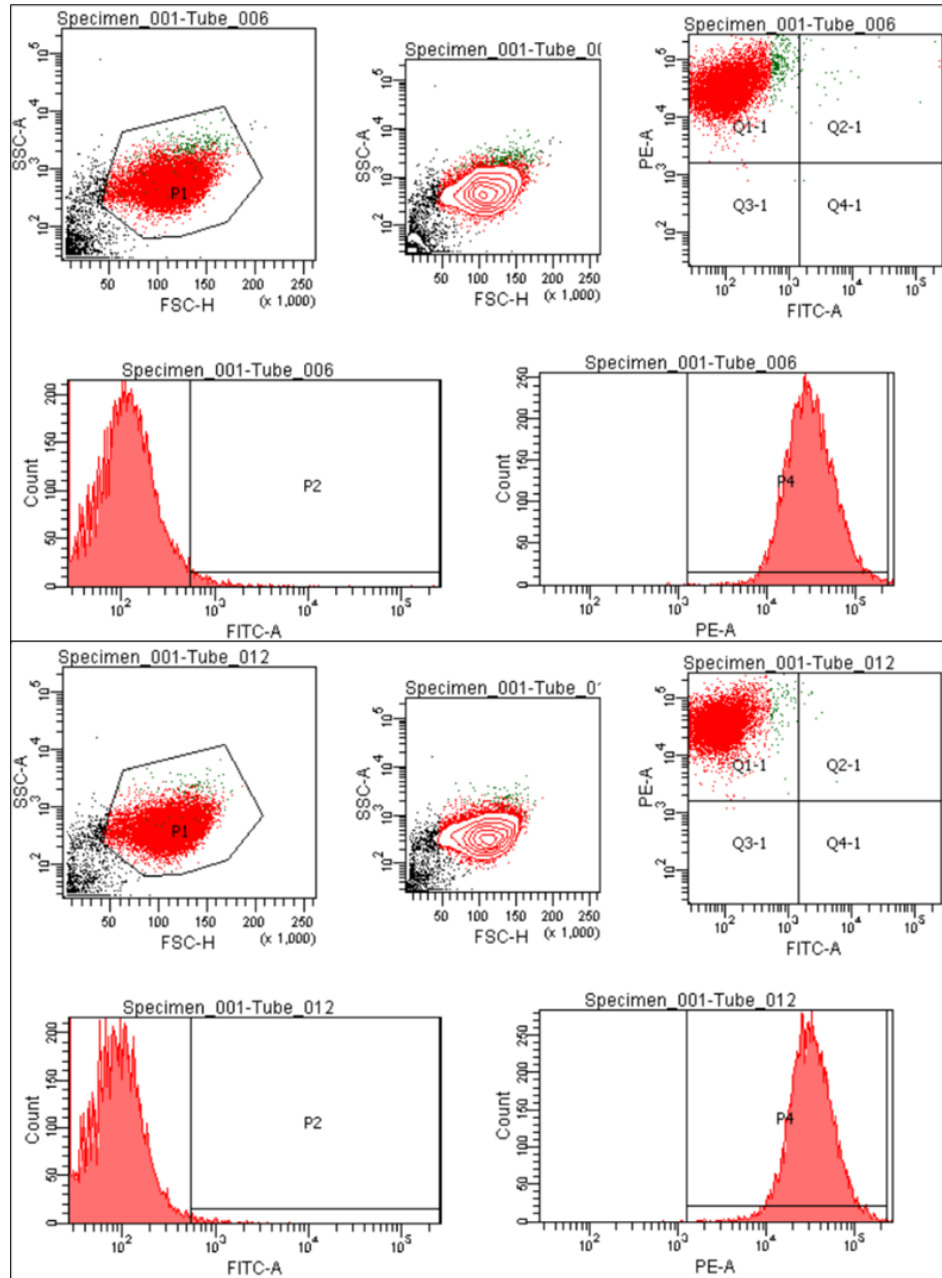


Figura B.6: Histogramas para muestras incubadas con FITC-anti CD11b y PE-anti CD29. Resultados para muestras de hASC cultivadas en monocapa en medio α -MEM antiOX (arriba) y α -MEM antiOX enriquecido (abajo).