

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