

03044
1
2e



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES

PROYECTO ACADÉMICO ESPECIALIZACIÓN, MAESTRIA
Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA
SEDE: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EVALUACION DEL CULTIVO DE CELULAS EN
MICROACARREADORES EN SUSPENSION PARA LA
PRODUCCION DE UNA VACUNA ANTIRRABICA DE USO
VETERINARIO

TRABAJO ESCRITO FINAL

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

ROSA MIREYA GALLEGOS Gallegos



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Resumen.

I .-	Introducción.....	1
I.1	Importancia e incidencia de la rabia.....	1
I.2	Características del virus de la rabia.....	2
I.3	Características de la enfermedad.....	6
I.3.1	Rabia en el ser humano.....	6
I.3.2	Rabia canina.....	7
I.3.3	Rabia paralítica bovina.....	8
I.3.4	Patogénesis de la rabia.....	9
I.4	Métodos para la prevención y control de la rabia.....	10
I.4.1	Vacunas tradicionales de tejido nervioso	10
I.4.2	Vacunas producidas en cultivos celulares	11
I.4.3	Situación mundial y en México.....	13
II .-	Objetivos.....	15
III.-	Origen y características de un cultivo de tejidos..	16
III.1	Cepas y líneas celulares.....	19
III.2	Células adheridas y no-adheridas a un soporte.....	20
IV .-	Requerimientos generales de un sistema de cultivo celular a gran escala.....	22
V .-	El suministro de oxígeno a los cultivos celulares..	23
VI.-	Métodos de inmovilización celular.....	25
VII.	Formas de operación de los sistemas de cultivo.....	26
VIII.	Sistemas para el cultivo de células a gran escala.	28
VIII.1	Sistema "Roller".....	29

VIII.2	Sistema IL40 de la película espiral tubular de Jensen.....	31
VIII.3	Fibras huecas o capilares artificiales.....	33
VIII.4	Matrices de cerámica.....	36
VIII.5	Camas fluidizadas.....	38
VIII.6	Microacarreadores en suspensión.....	39
IX.-	Selección del método de cultivo para la producción de una vacuna antirrábica de uso veterinario.....	45
X.-	Estrategia para la producción de la vacuna.....	48
X.1	Procesos preliminares a la producción de la vacuna.....	48
X.1.1	Selección de la línea celular.....	48
X.1.2	Selección de la cepa viral.....	49
X.1.3	Selección de los medios de cultivo y del DEAE-dextran.....	50
X.1.4	Selección del proceso operativo.....	52
X.2	La producción de un banco de células madre....	52
X.3	La producción de un lote de células semilla de trabajo.....	52
X.4	Obtención de un lote de virus semilla maestra.	53
X.5	Preparación de un lote de virus semilla de trabajo.....	53
X.6	Primera Fase. El cultivo celular.....	53
X.6.1.	Producción de las células para la siembra.....	53
X.6.2	Condiciones durante la fase de crecimiento celular.....	53
X.6.3	Variables que deben cuantificarse durante el crecimiento celular.....	55

X.6.4	Determinación del momento de la inoculación viral.....	55
X.7	Segunda Fase. Replicación viral.....	55
X.7.1	Inóculo viral.....	55
X.7.2	Condiciones que se modifican durante la replicación viral.....	56
X.7.3	Variables que deben cuantificarse durante la fase de replicación viral..	56
X.7.4	Determinación del momento de la cosecha de virus.....	57
X.8	Tercera Fase. Procesamiento del antígeno viral	57
XI.-	Control de Calidad.....	58
XI.1	Control de calidad de los insumos.....	58
XI.2	Control de calidad de la vacuna.....	58
XI.2.1	Control de la línea celular.....	59
XI.2.2	Control de calidad de la suspensión viral.....	60
XI.2.3	Control de calidad de la cosecha viral, después de la clarificación y la inactivación.....	60
XI.2.4	Control de calidad del lote final de vacuna.....	61
XII.-	Discusión.....	62
XIII.-	Conclusiones.....	68
XIV.-	Bibliografía.....	69
XV.-	Lista de abreviaturas.....	79

RESUMEN

En este trabajo se destaca la importancia de la incidencia de rabia en el país como un problema de zoonosis, lo cual justifica plenamente la necesidad de evaluar diferentes opciones tecnológicas que permitan un incremento en la producción de vacunas antirrábicas veterinarias como una de las medidas principales para el control de esta enfermedad.

Se analiza el potencial de los diferentes sistemas de cultivo de células animales que existen a la fecha, en términos de productividad y eficiencia en la elaboración de estas vacunas y se llega a la conclusión de que el sistema de cultivo de células sobre microcarreadores en suspensión es el más adecuado, de acuerdo a las características tecnológicas y las ventajas que éste ofrece.

Además se plantea y justifica una estrategia experimental para la producción y el control de calidad de una vacuna antirrábica veterinaria utilizando la línea celular BHK21 y la cepa de virus vacunal PV, en base a una revisión hemerobibliográfica, con lo cual puede analizarse más objetivamente el empleo de los microcarreadores en suspensión dadas las características particulares de este proceso.

I INTRODUCCION

I.1 Importancia e incidencia de la rabia

La rabia representa aún un gran enigma científico y un problema de salud pública relevante. Entendemos muy poco acerca de su verdadera patogénesis, por ejemplo : dónde se oculta el virus durante el largo periodo de su incubación? y qué mecanismo patofisiológico induce la enfermedad y la muerte?.

Con excepción de la Antártida, Australia, Inglaterra y algunas otras islas, la rabia animal permanece en todos los continentes (Rupprecht C.E., 1988). En los países desarrollados ha dejado de ser un problema urbano, presentándose principalmente en su forma silvestre, mientras que en los países del Tercer Mundo tanto la rabia urbana como la silvestre continúan causando estragos (Aguilar S.A., 1986).

En Europa y Norteamérica pueden pasar varios años sin que se presente un sólo caso de rabia humana. No obstante, se administran millones de dosis profilácticas de vacunas veterinarias y decenas de miles de tratamientos postexposición en seres humanos. En los países en vías de desarrollo todavía se presentan muchos casos de esta enfermedad en humanos y el 90% de las muertes resultan de la mordedura de perros a cientos de personas, principalmente niños.

Los registros de muerte por rabia en humanos son particularmente imprecisos, ya que una vez que se presentan los síntomas de la enfermedad, el paciente, generalmente, no acude al servicio médico, donde ya nada o poco puede hacerse por él, sino ofrecerle una muerte hostil en completo aislamiento. Sin embargo, se tienen registros de que en la India se reportan de 40,000 a 50,000 muertes de personas cada año, en China se estiman entre 5,000 y 7,000 y en Tailandia de 200 a 300. Todo ello a pesar de que sólo en Asia se aplican más de 3'000,000 de dosis de vacuna humana postexposición a la rabia en ese mismo lapso de tiempo (Baer G.M., 1988).

De acuerdo a los reportes del Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) durante 1984, en 11 países de Latinoamérica se registraron un total de más de 1'400,000 personas mordidas por animales y se administraron más de 350,000 tratamientos antirrábicos postexposición (Escobar C.E., 1988). Las dos terceras partes del número de casos de rabia humana en Latinoamérica corresponden a México y a Brasil (Acha P.N., 1985). En México se estiman más de 65 casos de muerte por esta enfermedad, y se aplican aproximadamente 80,000 tratamientos vacunales postexposición en ese mismo periodo (Secretaría de Salud, 1989).

Con el fin de controlar esta enfermedad en los animales, como una de las medidas más importantes para evitar el contagio al ser humano, el Programa Nacional de Salud ha iniciado campañas de vacunación antirrábica canina en forma gratuita, las cuales demandan de un promedio de 8'000,000 de dosis anuales (Secretaría de Salud, 1989). Adicionalmente debe contemplarse el problema que representa la rabia paralítica bovina (derriengue), lo cual incrementa la necesidad de una vacuna antirrábica veterinaria inocua, potente y económica. Se reporta que el impacto económico de este tipo de rabia, transmitida principalmente por vampiros al ganado vacuno, es bastante significativa, no obstante la falta de un sistema adecuado de diagnóstico y registro en el campo. Se estima que un promedio de más de 100,000 cabezas de ganado mueren cada año, equivalente a millones de dólares en pérdidas. En Latinoamérica el mayor número de casos se presenta en Brasil, México, Venezuela y Argentina (Baer G.M., 1975).

Las condiciones ecológicas y demográficas que prevalecen en la mayor parte de las poblaciones humanas y las grandes áreas urbanas, conducen a mantener la transmisión de la rabia y su endemicidad, ya que una población humana densa y susceptible convive con una gran cantidad de perros callejeros no vacunados. Lo anterior, aunado a la carencia de un programa de control eficaz, provocan una situación verdaderamente perniciosa (Acha P.N., 1985).

Se calcula que en Latinoamérica y en el Caribe, hay una población canina total entre 29'000,000 y 49'000,000 de perros, equivalente a una proporción de 1 perro por cada 8 a 13 personas en áreas urbanas, donde reside el 65% de la población total y se pronostica que para finales de este siglo este porcentaje se elevará a un 75% (aproximadamente 450 millones de personas). Esta población se asentará en áreas marginadas donde el hacinamiento, la insalubridad y la pobreza favorecerán el aumento de animales urbanos callejeros, tales como perros, gatos y roedores, con un consecuente incremento en el número de casos de enfermedades zoonóticas, en especial la rabia (Escobar C.E., 1988).

I.2 Características del virus de la rabia.

Estructura

En la Figura 1 se muestra la partícula del virus de la rabia, que posee una estructura en forma de bala de 180 nm. de longitud y 75 nm. de diámetro (Hummeler K., 1967), esta morfología es característica de la mayoría de los virus de la

Familia Rhabdoviridae, donde están incluidos el virus de la rabia, el virus de la estomatitis vesicular y otros virus relacionados con el virus de la rabia, como el Mokola, el del vampiro de Lagos, y el Duvenhague, entre otros (Shope R.E., 1984).

Cuando una célula ha sido infectada con el virus de la rabia, se puede observar que las partículas virales "brotan o geman" de la superficie de la membrana citoplásmica, con una cubierta externa formada por una bicapa lipídica (a similitud de los demás miembros de la Familia), adornada con múltiples peplómeros de 10 nm. de longitud; constituidos de glicoproteína viral (G) (de 67 kilodaltones <Kda>), los cuales dan la apariencia de púas y cubren toda la partícula excepto su extremo posterior.

La glicoproteína es la única proteína glicosilada del virus de la rabia y el antígeno de superficie principal, pues induce la formación de anticuerpos neutralizantes que son el blanco de la respuesta inmune de los linfocitos T.

La cubierta viral, constituida de lípidos derivados de la membrana citoplásmica de la célula huésped, está asociada estrechamente con una segunda membrana, la proteína matriz (M) (de 26 Kda.) localizada en forma externa a las proteínas del complejo de la nucleocápside. Todo el espacio interno dentro de esta cubierta lipoproteica está ocupado por el núcleo de la nucleocápside.

El núcleo helicoidal de la nucleocápside comprende las moléculas de la ribonucleoproteína (RNP) constituida por el genoma de ácido ribonucleico (ARN) de una sola cadena de sentido negativo, la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (NS) y la transcriptasa del virion (L)..LS1

La "cola" del virus representa la forma irregular de las partículas emergiendo de la membrana plasmática de la célula infectada.

Si se compara el genoma del virus de la rabia con el del virus de la estomatitis vesicular, los cuales pertenecen a la misma Familia, se observan diferencias en la composición y en la longitud de las secuencias intergénicas, que son más largas en virus de la rabia; lo cual se considera puede estar relacionado con la baja velocidad de transcripción y replicación de este virus (Wunner W.H., 1988).

A diferencia de la mayoría de las infecciones producidas por los Rhabdovirus, que producen efectos citolíticos directos, los daños del virus rábico son poco evidentes. Su efecto citopático en muchos cultivos celulares o en los cerebros de los animales infectados y el mecanismo de su virulencia todavía es incierto.

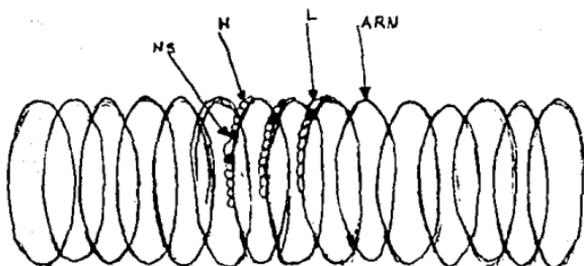
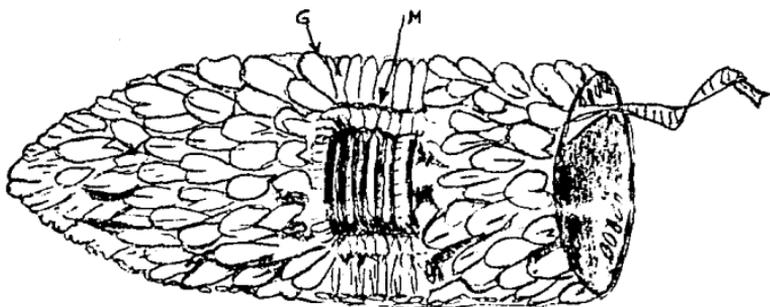
In vivo la replicación del virus rábico está casi completamente restringida al tejido nervioso del huésped, y su neurotropismo es la principal característica de esta enfermedad. Sin embargo, in vitro presenta una amplia variedad de células huésped, que comprende casi todas las células de mamíferos y aves, tanto las provenientes de cultivos de tejidos primarios como las líneas celulares derivadas de éstos (Wiktor T.J., 1975). Este comportamiento del virus rábico puede explicarse al revisar el mecanismo de la adsorción viral a los receptores celulares.

El suceso inicial dentro del ciclo de multiplicación viral ocurre en el reconocimiento del virion por los receptores celulares, que se encuentran en la superficie de la membrana plasmática. La unión del virion se lleva a cabo por una atracción electrostática entre las cargas de las proteínas superficiales del virion y las cargas complementarias del receptor celular específico.

La ausencia de un receptor celular que "reconozca" al virus, en general va ligada a un estado refractario natural, en el que la célula no permitirá la adsorción del virus y se dice entonces es insensible o resistente a ese virus.

Los tropismos tisulares que manifiestan los virus en un organismo sensible, rara vez son los mismos en el cultivo in vitro, y el espectro de sensibilidad de las células en cultivo es mucho más amplio que el del tejido u órganos de los cuales proviene el virus in vivo. Este incremento puede explicarse mediante la remodelación de los elementos de la membrana plasmática, durante la cual se exhiben receptores celulares que estaban ocultos o controlados epigenéticamente debido a un proceso de diferenciación.

Asimismo se ha observado que in vitro las células de ciertos animales son sensibles a la infección de un virus, al cual la especie es refractaria in vivo (Pastoret P.P., 1984).



RNP

FIGURA 1.- ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA RABIA, EN EL QUE SE MUESTRAN LAS PROYECCIONES DE GLICOPROTEINA (G) (PEPLOMEROS), LA PROTEINA (M) QUE DELINEA LA CUBIERTA VIRAL. EN LA PARTE INFERIOR SE OBSERVA LA HELICE DE LA NUCLEOCAPSIDE QUE INCLUYE LA RIBONUCLEOPROTEINA (RNP) CONSTITUIDA A SU VEZ POR EL GENOMA DE ARN, LA NUCLEOPROTEINA (N), LA FOSFOPROTEINA (NS) Y LA TRANSCRIPTASA DEL VIRION (Wunner W.H. et. al, 1988).

Aún se desconoce si el virus rábico utiliza una misma trayectoria, mediada por receptores comunes, para la penetración viral in vivo e in vitro, o si es reconocido por diferentes receptores en las células huésped (Wunner W.H., 1984).

I.3 Características de la enfermedad

La rabia es una enfermedad mortal, una vez que el animal o el humano presentan las manifestaciones clínicas. Sólo se sabe de tres casos de personas sobrevivientes, de los reportados hasta la fecha, lo cual sugiere que una inmunización a tiempo es la única protección que puede ofrecerse a los seres que han sido expuestos al virus de este padecimiento (Debbie J.G., 1988).

El ser humano puede ser vacunado después de haber estado expuesto a un animal rabioso o sospechoso de estarlo. Esta vacunación es única dentro del campo de las enfermedades infecciosas y se basa en el prolongado periodo de incubación del virus de la rabia de varias semanas, lo cual proporciona normalmente el tiempo suficiente para la formación de anticuerpos específicos (Vodopija I., 1988).

El periodo de incubación del virus rábico en los perros es, en promedio, de 3 a 8 semanas, pero en el hombre y en otros animales susceptibles hay una gran variabilidad.

La vacunación antirrábica preventiva se aplica únicamente a las personas que se encuentran en alto riesgo, cuando sus actividades están directamente relacionadas con la manipulación del virus (Shope R.E., 1984).

La administración de vacunas profilácticas se lleva a cabo principalmente en los animales, como perros, gatos y bovinos.

Algunas características clínicas sugieren la existencia de diferentes cepas de virus rábico, en las distintas regiones geográficas y en los mamíferos huéspedes. Entre estos fenómenos se encuentran diferentes tiempos de evolución de la enfermedad y dos formas clínicas diferentes: la rabia furiosa (agitada) y la parálitica (muda) que se presentan en seres humanos y en animales.

La ruta más común de la transmisión del virus rábico es a través de la piel, por una mordedura o arañazo producido por un animal infectado. También puede penetrar al cuerpo a través de las membranas mucosas sanas en contacto con un aerosol, o a los ojos mediante el transplante de una córnea infectada.

La evolución de la rabia puede dividirse en tres fases: la prodrómica, la excitativa y la parálitica. El término de rabia "furiosa" se refiere a los animales en los cuales la fase excitativa es predominante. En la rabia "muda" o parálitica, la fase excitativa es muy corta o ausente y la enfermedad progresa rápidamente hacia la fase parálitica.

I.3.1 Rabia en el ser humano.

Fase prodrómica.

Los síntomas prodrómicos en el ser humano no siempre se presentan, sin embargo, puede haber, dolor o parestesia en el lugar de la mordedura.

Fase excitativa

La hidrofobia es el síntoma mejor conocido de la rabia furiosa, es patognómico de esta condición y comúnmente la única anomalía neurológica en el paciente. Consiste en una contracción violenta y espasmódica del diafragma y los músculos relacionados con la inspiración, que se dispara cuando el paciente intenta beber algún líquido. Se asocian a ella otras características de terror y excitación, arritmias respiratorias y cardíacas, hipertensión y convulsiones generalizadas.

Durante la hidrofobia de la fase excitativa el enfermo cae finalmente en un estado de coma, y ésta es reemplazada por un patrón irregular de respiración, con grandes periodos apneicos (fase paralizante) que termina con la muerte (Warrel D.A., 1988).

Una vez que los signos y síntomas clínicos de la rabia se desarrollan, generalmente se presenta la muerte entre los 4 y 14 días posteriores (Tierkel E.S., 1975).

I.3.2 Rabia canina.

La fase prodrómica cuando es aparente, tarda entre 2 y 3 días, durante la cual el animal puede exhibir un cambio sutil de temperamento. Los perros "falderos" pueden volverse aún más

afectivos, mientras los normalmente afectivos mostrarse esquivos y volverse astutos e irritables. Durante esta fase puede presentarse un ligero aumento en la temperatura corporal, dilatación de las pupilas y un reflejo perezoso en la córnea.

La fase excitativa dura de 1 a 7 días, es cuando los signos de la enfermedad se reconocen más fácilmente, el perro se vuelve cada vez más irritable, inquieto y nervioso, sin embargo puede ser tan corta que a veces no es detectada. Durante la primera parte de esta fase tiende a alejarse de la gente, esconderse en lugares oscuros y muestra respuestas exageradas a los estímulos repentinos de luz o sonido. Posteriormente se hacen evidentes la fotofobia y la hiperestesia; ocasionalmente intenta capturar insectos u otros objetos imaginarios y con frecuencia, hay una tendencia a tragarse objetos, como palos, paja, piedras y tierra. Esta fase es la más peligrosa, pues el animal tiende a vagar sin rumbo y a morder todo lo que encuentra en su camino.

En la mayor parte de los casos, hay un cambio característico en el ladrido, debido a la parálisis de los músculos de la laringe. A semejanza de los síntomas en el hombre, se presenta dificultad en la deglución y el animal babea, debido a los espasmos y la parálisis eventual de los músculos involucrados. La respiración rápida y pesada causa la formación de espuma en la saliva. Al final de esta fase se presentan ataques convulsivos, falta de coordinación muscular, así como un aspecto perdido en la mirada.

Si el animal no muere, durante uno de los ataques, entra en la fase paralítica gradual de todo el cuerpo, seguida de un estado de coma y finalmente la muerte.

El curso clínico de la enfermedad dura aproximadamente 10 días, rara vez excede este periodo, incluida la fase prodrómica.

El curso clínico de la rabia paralítica o "muda", no es tan espectacular y a veces resulta difícil su diagnóstico.

I.3.3 Rabia paralítica bovina.

Para quienes manejan estos animales la falta de coordinación en los miembros posteriores del ganado bovino, es patognomónica de la enfermedad; de aquí el nombre de "derriengue" o mal de caderas. Si el animal no es enviado al matadero, los

signos más comunes que se presentan posteriormente son: anorexia, bramidos frecuentes, hocico fétido seco y engrosado, salivación excesiva, con un aumento gradual en la falta de coordinación y debilidad de los miembros posteriores. Finalmente apnea, paroxismos terminales y muerte.

El periodo de morbilidad varía de unos días a una semana, rara vez es mayor.

I.3.4 Patogénesis de la rabia.

Cuando un animal es mordido por un animal rabioso, el virus invade directamente los nervios periféricos, las terminales nerviosas, o permanece en las células del músculo estriado, donde se amplifica para una invasión posterior más eficiente de las terminales nerviosas, durante el desarrollo de la enfermedad.

Una vez que el virus ha entrado a las terminales nerviosas, sensoriales o motoras, el genoma viral es transportado dentro de los axoplasmas de las neuronas al sistema nervioso central.

La respuesta inmune del hospedero es muy leve durante la infección extraneural inicial y durante el transporte neural subsiguiente.

La transmisión de la rabia depende de la infección simultánea del sistema límbico del cerebro, ocasionando la furia que induce al animal a morder y de las glándulas salivales para la producción de grandes cantidades de virus transmitidos a través de la mordedura (Murphy F.A., 1977).

A pesar de que los signos clínicos de la enfermedad son muy impresionantes, los animales muertos por rabia, pocos o ningún cambio macroscópico en el sistema nervioso central; la única anormalidad visible es la congestión de las meninges. El examen histopatológico del sistema nervioso central revela una encefalitis viral singular, con una invasión neuronal intensa, pero con una destrucción celular limitada. El edema cerebral, común en la mayoría de las encefalitis virales, es raro en la rabia.

En 1903, Negri encontró dentro del citoplasma neuronal cuerpos de inclusión específicos que se tiñen con el azul de

metileno y eosina. Desde entonces, la rabia ha sido diagnosticada post-mortem por la presencia de estos corpúsculos que corresponden al sitio de replicación viral. La parte interna está compuesta de partículas virales asociadas a componentes celulares.

El periodo de incubación del virus y la evolución de la enfermedad es muy variable y depende, entre otros factores, de la dosis de virus inoculada, la cepa viral, el lugar y la gravedad de la mordedura (Fekadu M, 1988; Shope R.E., 1984).

I.4 Métodos para la prevención y control de la rabia.

De hecho hasta hace un siglo, no existía ningún método eficiente para la prevención de la rabia y su control se realizaba mediante la exterminación de los perros rabiosos y cauterizando las heridas que éstos causaban. Louis Pasteur, en 1885, fue quien elaboró por vez primera una vacuna antirrábica humana, al establecer el principio de la modificación de un virus, a través de la transferencia sucesiva en una especie animal.

Pasteur dió el nombre de virus de calle al virus de la rabia tal y como se presenta en la naturaleza. El lo modificó y atenuó mediante transferencias intracerebrales sucesivas en conejos, donde observó que el periodo de incubación del virus se acortaba en forma progresiva hasta volverse fijo, por lo cual a este nuevo agente viral modificado lo denominó virus fijo (Tierkel E.S., 1975).

I.4.1 Vacunas tradicionales de tejido nervioso.

Las vacunas tradicionales desde la primera elaborada por Louis Pasteur en 1885, se elaboran a partir de una suspensión de tejido nervioso, de animales previamente infectados con virus rábico atenuado. Posteriormente Fermi en 1908 y Semple en 1911, modificaron estas vacunas mediante la inactivación del virus con fenol, lo cual reducía el peligro del virus vivo en la vacuna.

En general, las vacunas provenientes de tejido nervioso, carecen de una potencia suficiente y provocan, tanto en el hombre como en los animales, un gran número de problemas postvacunales tales como: intolerancia, alergia, accidentes neuromusculares y ocasionalmente la muerte. Esto se debe, en gran parte, a la presencia de sustancias residuales como la mielina y otros factores encefalitogénicos.

Desde 1885 se han realizado múltiples esfuerzos para mejorar cada vez más la eficiencia y la inocuidad de las vacunas antirrábicas. Las vacunas de origen nervioso se preparan utilizando diferentes animales, como borregos, cabras y conejos. La concentración original de tejido nervioso fue del 5% y posteriormente, se redujo al 4%. El volumen de la dosis ha disminuido progresivamente de 5 a 2 ml. Los métodos de inactivación del virus se han modificado en cuanto a las condiciones para realizar este proceso y el agente que se utiliza, desde calor, fenol, rayos ultravioleta y B-propiolactona principalmente. Recientemente la liofilización ha permitido un incremento en la estabilidad de la vacunas, de aproximadamente 6 y hasta 18 meses.

A pesar de los inconvenientes las vacunas de origen cerebral, hasta 1982 aún se aplicaban al hombre en los tratamientos postexposición en 15 países en vías de desarrollo, de acuerdo a un reporte de la O.M.S.

En Chile, Fuenzalida y Palacios (1955), lograron un avance notable en la producción de las vacunas antirrábicas de origen nervioso. Utilizaron ratones lactantes de 3 a 5 días de nacidos, como huéspedes para la infección intracerebral, con lo cual lograron disminuir el contenido de mielina de la vacuna. Además, la inactivación con luz ultravioleta eliminó los efectos nocivos de los agentes utilizados anteriormente, como el fenol y el formol (Roumiantzeff M., 1984). Estas vacunas han resultado altamente antigénicas y mejor toleradas que las tradicionales, por lo cual han sido adoptadas en Latinoamérica y varios países de África, donde son utilizadas en tratamientos postexposición en humanos, y en las campañas de vacunación canina (Sureau P., 1988).

En 1959, casi al mismo tiempo en que se desarrollaron las vacunas tipo Fuenzalida, Powell y Culbertson propusieron una vacuna de uso humano, producida en embriones de pato, pero esta carecía de potencia y presentaba complicaciones postvacunales. En los años 40's, Koprowski y Cox iniciaron la producción de una vacuna antirrábica utilizando embriones de pollo y las cepas de virus rábico Flury LEP (Low Egg Passage) y la cepa HEP (High Egg Passage), pero debido al alto riesgo de estas vacunas vivas atenuadas, su uso fue exclusivamente veterinario.

I.4.2 Vacunas producidas en cultivos celulares.

Un verdadero avance fue logrado con el desarrollo de las vacunas producidas en cultivos celulares. Kissling en 1958, demostró la posibilidad de obtener virus rábico en células de origen no nervioso, usando células primarias de riñón de hamster (criceto). Otros cultivos primarios utilizados después para este

propósito, fueron los de riñón fetal bovino, el de riñón canino y el de riñón de cerdo.

Posteriormente, en 1964, Wiktor, Fernández y Koprowski del Instituto Wistar, fueron los pioneros en la elaboración de vacunas antirrábicas humanas en cultivos celulares, quienes desarrollaron la vacuna en células diploides humanas.

Atanasiu en 1973 y Chapman en 1974, emplearon por primera vez la línea celular BHK21 (Baby Hamster Kidney) como sustrato para la replicación del virus rábico y Larghi en 1976, preparó una vacuna de uso veterinario en monocapas de células BHK21 inoculadas con la cepa de virus rábico PV (Guidolin R., 1983).

Las vacunas producidas en cultivos celulares resultaron altamente antigénicas y bien toleradas, pero con rendimientos muy bajos, por lo cual se requiere de procesos de concentración y purificación que elevan demasiado su costo. Esto ha creado un gran obstáculo para su producción y uso extensivo, sobre todo en los países en vías de desarrollo, donde más se requieren.

Las vacunas antirrábicas de uso humano desarrolladas recientemente, corresponden a las producidas en células diploides humanas y en células VERO. En 1984, el 95% de la producción mundial de la primera, se elaboraba en Francia por Rhône-Mérieux, pero un tratamiento postexposición costaba más de 250 USD. Entre los esfuerzos que se han realizado para producir vacunas de origen celular más económicas y a gran escala se encuentra el uso de las células VERO, una línea celular continua proveniente de células de riñón de mono verde, cultivadas en microacarreadores en suspensión por el Instituto Mérieux, de Francia. Esta línea celular crece más rápidamente, y es más resistente que la cepa diploide y produce mejores rendimientos virales, por lo cual esta vacuna resulta aproximadamente un 40% más barata, pero conserva una respuesta antigénica y tolerancia similares (Roumiantzeff M., 1984).

A nivel mundial, se encuentran en uso cuatro tipos de vacunas antirrábicas humanas: 1) las vacunas de cerebro de ratón lactante (tipo Fuenzalida) principalmente en América Latina; 2) la vacuna de embrión de pato, en algunos países en vías de desarrollo; 3) las vacunas producidas en cultivos celulares, en Europa y Norteamérica y 4) las vacunas de cerebro de conejo, borrego y cabra (tipo Semple y Fermi) más frecuentes en Asia.

Las vacunas de cultivos celulares utilizan varios tipos de células en su elaboración: 1) células diploides humanas (WI-38 o MRC-5) y células VERO, para uso humano. 2) células de riñón de

hamster (BHK21), 3) células de riñón fetal bovino, y 4) fibroblastos de embrión de pollo, para uso veterinario (Roumiantzeff M., 1984).

La O.M.S. recomienda que ninguna vacuna con virus vivo debe administrarse al hombre, y que los países en donde todavía se producen vacunas de tejido nervioso, éstas deben sustituirse por vacunas de cultivos celulares (O.M.S., 1982).

I.4.3 Situación mundial y en México.

Las vacunas de vanguardia producidas por la ingeniería genética, ya tienen un representante para el caso de la rabia. Se trata de una vacuna de un virus recombinante Vaccinia-glicoproteína de la rabia, la cual se encuentra en pruebas de laboratorio y de campo para el control de la rabia silvestre en varios países de Europa y en Norteamérica (Aguilar S.A., 1989; Rupprecht C.E., 1988).

En los países desarrollados, los métodos básicos para el control de la rabia en animales domésticos, especialmente la canina, consisten en evitar la transmisión de esta enfermedad, del perro al hombre, o de un perro a otro, a través de la administración de un gran número de vacunas veterinarias a los animales particulares, en un corto periodo de tiempo y eliminando en forma simultánea los perros callejeros, o sin dueño (Baer G.M., 1988).

En Latinoamérica, en las grandes ciudades el porcentaje de perros que son vacunados es muy bajo, aproximadamente el 38% del total, e insignificante la eliminación de perros callejeros, alrededor del 1% del total. Además tanto el suero antirrábico, necesario en el tratamiento de los casos de exposición más graves, como las vacunas son insuficientes y están mal distribuidas en toda la región (Escobar C.E., 1988).

Las vacunas de uso veterinario tienen menos requerimientos de control de calidad, debido principalmente al tiempo de vida media de las especies domésticas; por ello aún aquellas de origen nervioso, como la de cerebro de borrego y de cabra, y las vacunas vivas atenuadas producidas con la cepa LEP Flury en embrión de pollo todavía se aplican en los países de Medio Oriente y Africa (Shope R.E., 1984).

En México se pueden adquirir vacunas veterinarias comerciales producidas en embriones de pollo, LEP y HEP Flury, así como de cultivo celular, utilizando la línea BHK21 inoculada con cepas de virus rábico patentadas, o exclusivas; estas últimas gozan de un mayor prestigio por su antigenicidad e inocuidad, pero resultan más caras que las de tejido nervioso.

Los métodos de producción utilizados por la iniciativa privada se desconocen, porque esa información es inaccesible para el público en general. Dentro del sector público, el Instituto Nacional de Virología de la Secretaría de Salud es el encargado de la producción de todas las vacunas antirrábicas de uso humano tipo Fuenzalida, que se aplican en todos los tratamientos postexposición. También produce 1'600,000 dosis/año de vacunas veterinarias de esta misma clase (Kado B.G., 1991), pero esta cantidad no alcanza a satisfacer la demanda de las campañas antirrábicas de la Secretaría de Salud.

Hasta ahora, de las vacunas antirrábicas disponibles a nivel mundial, la mejor alternativa son las que se producen en cultivos celulares, pues presentan mayor inocuidad, potencia y la posibilidad de elaborarlas a gran escala.

II.- OBJETIVOS

El panorama general de la rabia, a nivel mundial y en México permite percatarse de la necesidad de incrementar la producción de vacunas antirrábicas veterinarias, lo cual podría lograrse mediante el empleo de una tecnología de cultivo celular a mayor escala que disminuya el costo de este tipo vacunas; lo anterior facilitaría el desarrollo de las campañas gubernamentales destinadas al control de esta enfermedad. Por ello en este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

1) Efectuar un análisis y comparación de los diferentes sistemas de cultivo de células a gran escala que existen a la fecha, en base a una revisión hemerobibliográfica, como una alternativa para la elaboración de vacunas antirrábicas veterinarias, más seguras, potentes y económicas, respecto a las que actualmente se producen en nuestro país.

2) Plantear una estrategia de producción y del control de calidad requerido para una vacuna antirrábica veterinaria, con base en la información hemerobibliográfica disponible.

3) Evaluar la aplicación del sistema de cultivo de células a gran escala que resulte más promisorio de acuerdo a la estrategia de producción planteada.

III ORIGEN Y CARACTERISTICAS DE UN CULTIVO DE TEJIDOS

El cultivo de tejidos se utilizó por primera vez a principios de este siglo; Harrison en 1907 y Carrel en 1912 lo propusieron como una técnica para estudiar el comportamiento de las células animales fuera de las variaciones sistémicas del organismo, durante la homeostasis normal, o bajo la tensión de un experimento.

El hallazgo de que las células provenientes de los tumores de origen humano originaban líneas celulares continuas, acrecentó aún más el interés por esta técnica, cuyo principal objetivo fue el estudio del cáncer. Posteriormente, algunos investigadores interesados en aspectos especiales del desarrollo la adoptaron para el estudio, a nivel celular o bioquímico, de la regeneración de los tejidos en anfibios, o la metamorfosis de los insectos. Desde entonces ha contribuido al avance de la biología celular, la bioquímica, la fisiología, y la cirugía reconstructiva, pues facilita el aislamiento y la manipulación de las células, sus componentes y productos (Freshney R., 1983).

Tiempo después, el cultivo de tejidos se ha aplicado a la agricultura, en la realización de diversos estudios de fitopatología, la micropropagación de los vegetales y la producción de substancias de interés industrial como los alcaloides y las fitohormonas, entre otros (Tomes E.H., 1982; CONAFRUT-SARH, 1983).

En el Cuadro N° 1 se presentan los productos celulares más importantes en el mercado mundial que se obtienen a través del cultivo de células, donde puede observarse que el área médica es el campo de aplicación de mayor importancia, en la prevención, el diagnóstico y la terapia de muchas enfermedades. Las vacunas son uno de los productos más importantes y ocupan el segundo lugar, con un mercado de 5,200 millones de dólares.

CUADRO 1

MERCADO MUNDIAL PARA 1991 DE DIFERENTES PRODUCTOS QUE SE OBTIENEN
EN EL CULTIVO DE CELULAS DE MAMIFERO.

Area de productos	Mercado Mundial (Millones de USD)
Diagnóstico	6,500
Vacunas	5,200
Hormonas	4,900
Linfocinas	1,750
Anticuerpos monoclonales	1,700
Otros productos	3,040

(factor de crecimiento epidérmico, dismutasa superóxido, factor atrial natriurético, eritropoyetina, proteína C, factor VIII, activador plasminogénico de tejidos, entre otros)

FUENTE: Ratafia M., 1987

Ventajas del cultivo de tejidos.

Entre las principales ventajas del cultivo de tejidos se encuentran las siguientes:

1.- Permiten el control del medio ambiente fisicoquímico de las células en estudio. El pH, la temperatura, la presión osmótica, la presión parcial de oxígeno, entre otros. La composición química de la mayor parte de los medios de cultivos no puede definirse totalmente, pues requieren de suero como suplemento, el cual es muy complejo y variable en su composición, ya que contiene hormonas y otras sustancias de regulación aún no determinadas.

2.- Homogeneidad en el tejido. Las muestras de tejido primario son invariablemente heterogéneas, ya que poseen varios tipos celulares, y después de uno o dos subcultivos los linajes de células sobrevivientes adquieren un aspecto uniforme, o una constitución homogénea. La presión de selección de las condiciones del cultivo tiende a producir un cultivo homogéneo del tipo celular más vigoroso, por lo tanto, cada replicado experimental es virtualmente idéntico y rara vez se requiere de un análisis estadístico.

3.- Economía de los reactivos en estudio, pues éstos pueden ponerse en contacto directo con las células, en contraste con las cantidades necesarias cuando estas pruebas se realizan en animales en experimentación.

Desventajas del cultivo de tejidos.

1.- Requieren de una elevada habilidad en el manejo de las técnicas asépticas y de un manejo meticuloso, dado que las células crecen más lentamente y son más frágiles, que la mayoría de los contaminantes comunes.

2.- Requieren de un medio de cultivo de composición compleja y de unas condiciones similares a las del plasma sanguíneo, o a las del líquido intersticial, pues son células de organismos pluricelulares incapaces de subsistir en forma independiente; por ello es necesaria una gran experiencia y conocimientos, indispensables para la detección de los requerimientos y fallas eventuales del sistema de cultivo celular.

3.- Costos elevados, esta es una de las limitaciones más importantes, ya que se requiere de muchos materiales y esfuerzo para producir, relativamente, pequeñas cantidades de células. El costo de las células en cultivo es aproximadamente diez veces mayor que el de los tejidos animales.

4.- Inestabilidad de muchas líneas celulares continuas, como consecuencia de su constitución cromosómica, generalmente aneuploide.

Principales diferencias del cultivo de células in vitro, respecto a las células in vivo.

a) Disociación de las células de una geometría tridimensional a su propagación, generalmente en un sustrato bidimensional, lo cual implica la pérdida de interacciones celulares heterotípicas específicas. Muchas células se hacen móviles y empiezan a proliferar, incrementándose la fracción poblacional en crecimiento, y posteriormente la formación de una línea celular representa sólo uno o dos tipos celulares.

b) El medio de cultivo de tejidos carece de muchos de los componentes sistémicos involucrados en la regulación homeostática in vivo, principalmente de los del sistema nervioso y endócrino, por lo que no es verdaderamente representativo del tejido del cual deriva.

c) La energía para el metabolismo in vitro proviene principalmente de la glicólisis, y aunque el ciclo del ácido cítrico es funcional, juega un papel secundario.

Hay tres métodos principales para iniciar un cultivo de tejidos:

1) Cultivo de órganos, éste implica que se conserva la arquitectura característica del tejido in vivo, al menos parcialmente. El tejido se cultiva en la interfase líquido/gas sobre una reja, gel o "salvavidas".

2) Cultivo de explante primario, en el cual un fragmento del tejido proveniente de un organismo se coloca en la interfase líquido/plástico o vidrio, donde se presenta la adhesión y se promueve la migración al sustrato sólido.

3) Cultivo de células, éste implica que el tejido, o el crecimiento desordenado del explante primario se dispersa (mecánica o enzimáticamente) para obtener una suspensión celular homogénea que se cultiva como una monocapa adherente en un sustrato sólido, o como una suspensión en el medio de cultivo.

III.1 Cepas y líneas celulares.

La formación de líneas celulares es factible gracias a la proliferación de los cultivos de explantes primarios de tejidos. Una fracción significativa de la población celular en crecimiento se dispersa y puede cultivarse o sembrarse nuevamente en otros recipientes, lo cual constituye un subcultivo o pase celular. Estos cultivos son potencialmente el inicio de una "línea celular", el cual implica:

1) Un incremento en el número total de células durante varias generaciones.

2) El predominio de linajes o cepas celulares con una elevada capacidad de crecimiento, lo cual proporciona un cierto grado de uniformidad a la población.

3) La cepa celular originada puede caracterizarse para la mayor parte de su periodo de vida finito.

4) Finalmente la transformación de una cepa celular a una línea celular "continua o establecida" con un periodo de vida teóricamente infinito, implica generalmente un cambio fenotípico (Freshney R., 1983).

En la Figura 2 se muestra el diagrama de la generación de una cepa o linaje celular y la formación eventual de una línea celular continua.

III.2 Células adheridas y no-adheridas a un soporte.

Existen dos clases de células de mamífero respecto a su comportamiento in vitro ante un soporte de cultivo:

Células adheridas o ancladas, son aquéllas que requieren, en forma indispensable, de una superficie sobre la cual puedan unirse para desarrollarse. Con esta finalidad se han utilizado soportes de diferentes materiales inertes, los cuales no deben interactuar, o adsorber los componentes del medio de cultivo, y proporcionan únicamente un soporte físico cargado electrostáticamente para favorecer esta unión, sin que altere el crecimiento celular. Esta es la forma de cultivo más común para la mayor parte de las células primarias normales (con la excepción de las células hemopoyéticas maduras) las cepas celulares diploides y algunas líneas celulares transformadas (CHO, VERO, entre otras) (Freshney R., 1983).

Las células primarias y las cepas diploides humanas poseen un ciclo de vida finito y presentan elevados requerimientos de suero, lo cual limita severamente su utilización, pero su carácter "normal" (diploide) y la carencia de oncogenicidad las hacen favoritas en la producción de muchas vacunas, especialmente para uso humano (Miller A.O.A., 1989).

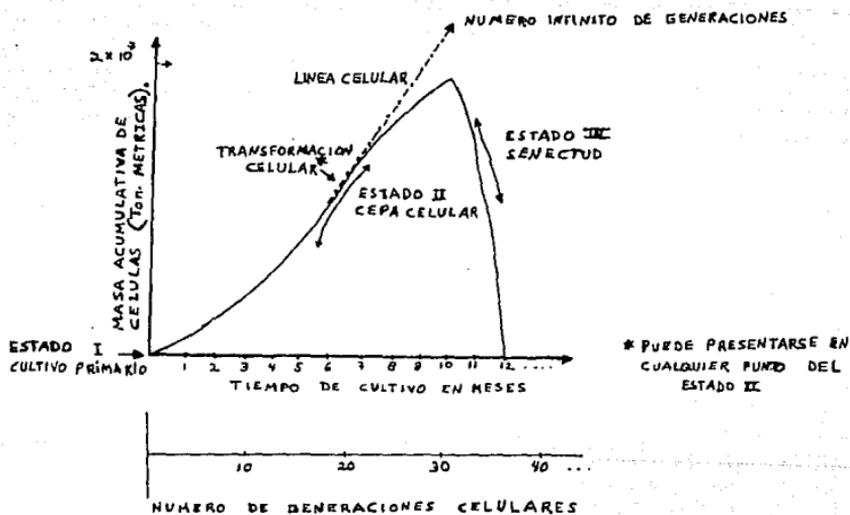


FIGURA 2.- DIAGRAMA DE LA GENERACION DE UNA CEPA Y UNA LINEA CELULAR (Harakas N.K., 1984).

Células no-adheridas son aquéllas que son capaces de crecer como agregados celulares suspendidos en el medio de cultivo. Pertenecen a esta categoría las células hemopoyéticas maduras, algunas líneas celulares transformadas y las que provienen de tumores malignos (Freshney R. 1983). La inmortalidad de muchas líneas transformadas las hace alternativas atractivas para la producción de biológicos, pero su oncogenidad, bajo ciertas condiciones, ha limitado su uso extensivo (Miller A.O.A., 1989).

El cultivo de células de mamífero a altas densidades permite la reducción del costo de los productos de origen celular, mediante la concentración del producto y por lo tanto una disminución de los gastos de purificación. Además un rendimiento celular elevado involucra una utilización más eficiente del medio de cultivo y consecuentemente un producto final más económico, por ello es importante conocer cuales son los requerimientos para este tipo de cultivos.

IV.-REQUERIMIENTOS GENERALES DE UN SISTEMA DE CULTIVO CELULAR A GRAN ESCALA.

Las células de mamífero son sumamente susceptibles a las condiciones ambientales adversas. El metabolismo celular, su crecimiento y su viabilidad dependen de un control estricto y continuo dentro del recipiente de cultivo, para ello. Un buen bio-reactor de cultivo celular, será aquel cuyo diseño:

1) Disminuya al máximo las fuerzas mecánicas generadas durante la homogenización y la aeración del sistema, las cuales pudieran dañar las células de mamífero que carecen de una pared celular, a diferencia de otros microorganismos cultivables.

2) Permita o mejore la factibilidad de llevar a cabo un registro más fidedigno y un mayor control del proceso

3) Disminuya las probabilidades de contaminación del proceso.

Un medio ambiente uniforme durante el proceso puede lograrse mediante un control térmico, un mecanismo para la adición de nutrientes y la remoción de desechos con una alteración mínima del proceso y un suministro adecuado de oxígeno sin que éste provoque la formación de espuma, pues la tensión superficial de ésta es nociva a las células.

Un registro fidedigno y un control eficaz del proceso, requiere que el bio-reactor posea algún mecanismo para verificar en forma precisa el pH, oxígeno disuelto (O.D.), y temperatura. Así como también dispositivos para la determinación de otros parámetros principalmente, la densidad celular, la concentración de glucosa, lactato y amonio y, en el caso de un sistema que opere con perfusión, una regulación confiable de la entrada o salida de fluidos (Martin N., 1987). (Los diferentes sistemas de operación se describen posteriormente en este trabajo).

V.- EL SUMINISTRO DE OXIGENO A LOS CULTIVOS CELULARES.

El abastecimiento de una cantidad adecuada de oxígeno a los grandes volúmenes de las células en cultivo es la barrera crítica para el escalamiento, principalmente para los sistemas en suspensión.

El oxígeno es poco soluble en el medio de cultivo, 0.2 mmol/ l. (Fleischaker R.J., 1982) y la demanda promedio de oxígeno para un cultivo con una densidad de 10^6 células/ml., se encuentra entre 0.05 y 1.0 mmol./l-h.; equivalente a un coeficiente de transferencia de oxígeno (coeficiente k_{1a}) de 0.25 a 5 h^{-1} .

Una forma de suministro de oxígeno al sistema, es a través del espacio aéreo superior del recipiente de cultivo, sin embargo, si se toma como ejemplo una suspensión de células HeLa a una concentración de 1×10^7 células/l, éstas requerirán de 5.0 mmol de Oxígeno/l x h. (Danes S.B., 1963) y se presentará una limitación de oxígeno en un volumen menor de 1 l cuando el espacio contiene aire. Si este espacio se llena de oxígeno, la limitación se presentará cuando el volumen del cultivo sea de 3.5 l Por consiguiente se debe suministrar oxígeno en forma adicional, y en forma directa al medio de cultivo cuando el volumen sea superior a este volumen.

Generalmente la manera de proporcionar oxígeno a los cultivos es a través del burbujeo, este es el método empleado en las fermentaciones microbianas, pero no es el adecuado para las células animales pues causa lisis de la membrana celular y demasiada espuma en el medio de cultivo, debido a los altos contenidos proteicos y de suero, por lo que se han buscado otras alternativas.

Una de las estrategias consiste en la circulación de una fracción del medio de cultivo a través de la cámara de crecimiento, mientras simultáneamente en un circuito externo

se oxigena otra parte del medio. La ventaja de este método es que la velocidad de circulación del medio determina la cantidad de oxígeno que se provee a las células.

Una alternativa más es aumentar el área del cultivo que se encuentra en contacto con el aire; éste es el principio esencial del uso del tubo de silicón, a través del cual se difunde el oxígeno al medio, el tubo puede introducirse directamente al recipiente, o revestir con él su superficie. Esta técnica resulta demasiado cara, ya que requiere de una gran superficie de contacto y este material es costoso. Además su manejo puede resultar demasiado complicado para grandes volúmenes.

El área total del recipiente de cultivo celular puede ser de un material permeable al oxígeno, por ejemplo, los sistemas de cultivo de capilares artificiales y la película tubular en espiral de Jensen utilizan esta técnica.

Asimismo, el desarrollo de medios libres, o con cantidades muy reducidas de suero, contribuirá a la solución del problema de transferencia de oxígeno en los cultivos celulares a gran escala, al evitar el exceso de espuma cuando se aerea el medio de cultivo (Glacken M.W., 1983).

VI.- METODOS DE INMOVILIZACION CELULAR.

El escalamiento de los cultivos celulares es todavía un desafío, pues plantea nuevos problemas diferentes de aquellos de las fermentaciones microbianas, debido a las características de las células animales, entre ellas : 1) La fragilidad de las células animales por las fuerzas de fricción asociadas a los métodos tradicionales de mezclado con agitación mecánica que las destruyen; 2) el largo tiempo de duplicación, en promedio de 18 a 48 horas, contra 20 ó 30 minutos para la mayor parte de las bacterias, incrementa la importancia de la asepsia del cultivo celular; 3) las células animales generalmente no crecen a densidades tan elevadas como los microorganismos, el intervalo de concentración promedio es de 0.5 a 5×10^6 células/ml. Entre los factores que limitan la densidad celular se incluyen el aumento de subproductos metabólicos, tales como el lactato y el amonio, así como la escasez de nutrientes.

Estas peculiaridades del cultivo de células han llevado a un objetivo principal: proteger las células a través de dos enfoques diferentes:

1) Las células no-adherentes, o que son capaces de crecer sin unirse a un soporte, se cultivan en una suspensión libre y homogénea, mediante nuevos diseños especiales de agitación y aeración que no las maltraten, en bio-reactores similares a los que se utilizan tradicionalmente para las fermentaciones microbianas y cuando éstas son demasiado frágiles, pueden atraparse en microcápsulas, gel o en algunas fibras capilares.

2) Las células adherentes o ancladas a un soporte, se inmovilizan en matrices de materiales inertes que son bañadas por, o sumergidas en, el medio de cultivo.

Los procedimientos de inmovilización celular tienen muchas ventajas, pues permiten: a) aumentar la densidad celular del cultivo, con la consecuente elevación de la productividad en espacios más reducidos. Esto a su vez, b) simplifica los procesos de concentración y purificación del producto celular y c) facilita la operación del bio-reactor al realizar el cambio del medio de cultivo, o durante la cosecha, ya que las células pueden separarse rápidamente; d) En algunos sistemas, la homogenización del medio y la aeración del mismo, puede llevarse a cabo en un circuito externo al de la cámara de crecimiento (Knight P., 1989).

El largo tiempo de duplicación de las células ha llevado al desarrollo de cultivos continuos, donde los productos secretados por las células, se concentran en el medio de cultivo y se cosechan constantemente, sin la necesidad de que se interrumpa el proceso y se realicen nuevas siembras celulares en el bio-reactor, lo cual también contribuye a un producto final de menor costo. Sin embargo esta técnica sólo puede emplearse cuando el producto final es extracelular, mas no cuando las células son el producto.

Los métodos para la inmovilización de células adherentes o que requieren anclarse, incluyen: los capilares artificiales, los microacarreadores en suspensión, y las matrices microporosas (Van Brunt J., 1986; Familletti P.C., 1988).

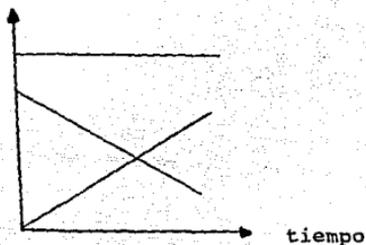
VII.- FORMAS DE OPERACION DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO.

Existen tres formas de operar un sistema de cultivo, aplicables tanto a los cultivos de células microbianas como a los de células animales, éstos son: en lote, lote alimentado y perfusión, las condiciones de operación correspondientes pueden observarse en la Figura 3.

Sistema en lote.- En él no hay un suministro adicional de nutrientes, únicamente los que se proporcionan al inicio del cultivo. Durante el proceso lo único que se introduce al medio es oxígeno. Solamente pueden controlarse el pH, la temperatura y el flujo de aire; en consecuencia el medio ambiente de las células en cultivo está cambiando constantemente. Los nutrientes se van agotando y se acumulan progresivamente los productos del metabolismo, generalmente de desecho, lo cual produce una inhibición prematura del crecimiento celular y/o de la formación del producto. Este efecto puede mitigarse mediante un cambio del medio "gastado" por medio "nuevo", pero resulta demasiado costoso, ya que algunos componentes costosos, como el suero se descartan, aún cuando no han sido completamente consumidos.

Sistema de lote alimentado.- En éste se suministran los componentes vitales, sólo cuando el cultivo los requiere para mantener constante la concentración de los nutrientes. Estos procesos requieren de los mecanismos necesarios para el registro y control fidedigno de los nutrientes, lo cual permite la optimización del crecimiento celular y/o la formación del producto. Aún cuando los productos metabólicos de desecho no se eliminan, su acumulación puede limitarse al ajustar el flujo de nutrientes.

LOTE

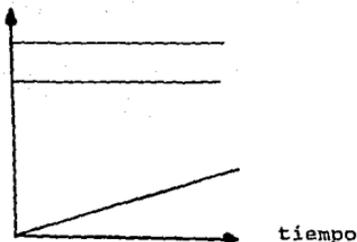


pH, temperatura, O.D.

desechos

nutrientes

LOTE ALIMENTADO

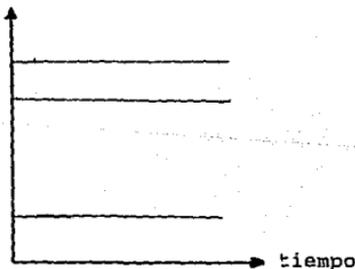


pH, temperatura, O.D.

nutrientes

desechos

PERFUSION



pH, temperatura, O.D.

nutrientes

desechos

FIGURA 3 EVOLUCION DE LAS VARIABLES EN LOS CULTIVOS OPERADOS EN LOTE, LOTE ALIMENTADO Y PERFUSION (Glacken M.W., 1983).

Sistema en perfusión.- Este funciona de manera similar al cultivo continuo, en el que la concentración de los nutrientes y de los productos de desecho se mantienen constantes, modificando la velocidad de dilución del sistema. La única diferencia radica en que en este último las células no se retiran del cultivo. Si se incrementa la velocidad de adición de nutrientes se obtienen mayores concentraciones de éstos en el medio y se disminuyen las de los productos de desecho. El medio ambiente de cultivo es bastante controlado, sin embargo comparte algunas de las desventajas del sistema en lote alimentado, esto es, parte de los nutrientes y componentes del suero aún no metabolizados se eliminan en el efluente, por lo cual resulta económico sólo cuando con una concentración reducida de los productos de desecho, se obtienen densidades celulares mayores a las del cultivo en lote alimentado.

VIII.- SISTEMAS PARA EL CULTIVO DE CELULAS A GRAN ESCALA.

Las células no adherentes se han cultivado generalmente, en sistemas similares a los utilizados para los microorganismos, con algunas modificaciones, en especial, relacionadas con el diseño del mecanismo de aeración y homogenización, tratando de evitar los daños por fricción y choques entre las partículas.

En contraste, las células adherentes o ancladas plantean nuevos problemas para su escalamiento, debido a las características particulares de éstas, las cuales crecen formando una monocapa sobre el soporte. Cuando hay contacto entre ellas o con una barrera física, se inhibe su crecimiento, por ello la superficie disponible en el recipiente de cultivo, es uno de los factores limitantes de la densidad final.

Este trabajo se enfoca a los sistemas de cultivo de células adherentes o ancladas, ya que éstas son las alternativas más atractivas para la producción de vacunas, debido a su constitución cromosómica, generalmente diploide, a la carencia de oncogenicidad y a que presentan un crecimiento ordenado sobre el soporte, autoregulado a través del contacto entre ellas, en lo cual se asemejan a las células primarias "normales" (Miller A.O.A., 1989).

A nivel de laboratorio, el cultivo de células en monocapa o monoestrato estático es uno de los más comunes y se realiza en botellas de vidrio o polipropileno, tipo Roux, Blake o similares, cuya capacidad es reducida, en promedio, entre 25 y 300 cm² de

área disponible para crecimiento. Estos sistemas son cerrados, por lo cual no existe un registro o control durante el proceso y la temperatura es la única condición estable. La relación de superficie de crecimiento (S), respecto al volumen total del cultivo (V) es muy reducida, y por lo tanto estas características limitan los rendimientos celulares de esta clase de sistemas.

En la Figura 4 se muestra una botella tradicional de cultivo celular en monocapa, en un sistema estático y cerrado. La relación superficie a volumen (S/V) para este tipo de cultivos es, en promedio, de sólo 0.4 .

VIII.1 Sistema "Roller".

Uno de los intentos más exitosos en el desarrollo de nuevos sistemas de cultivo celular con una mayor superficie disponible para el crecimiento celular, con relación al volumen total del cultivo es el sistema de botellas giradoras o "Roller", cuya relación S/V es aproximadamente 5.0, o sea más de diez veces mayor que la del cultivo estático. En la Figura 5 se observa una botella tipo "Roller" y el sistema de rotación de las mismas.

El sistema tipo "Roller" representa un gran avance respecto a los sistemas estáticos, pues permite llevar a una mayor escala los cultivos celulares, facilita la oxigenación mediante la exposición alterna al espacio aéreo y al medio de cultivo durante la rotación de la botella y permite el incremento de los rendimientos celulares; pero éstos aún son reducidos, se pueden producir aproximadamente 3×10^7 células en un área de 500 cm^2 . No obstante, presentan varias desventajas, entre ellas: es un proceso muy laborioso, el lote de células o producto es heterogéneo, pues cada botella representa una unidad experimental diferente; no pueden tomarse muestras durante el proceso y por lo tanto, no existe un control del mismo. Además requiere de grandes espacios.

Una forma de escalamiento para incrementar la productividad de células ancladas, o de sus productos, es a través de un aumento en el número de unidades de cultivo que se manejan, sin modificar el volumen del cultivo en cada una, con lo cual se consigue una mayor superficie para el crecimiento. Este modo de escalamiento ha sido el empleado en muchos laboratorios que utilizan las botellas tipo Roux, Blake o similares, así como para el sistema "Roller".

FIGURA 4.- BOTELLA TRADICIONAL PARA EL CULTIVO CELULAR EN SISTEMA ESTATICO Y CERRADO.

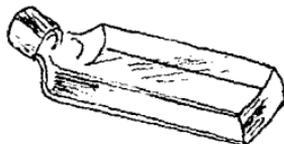
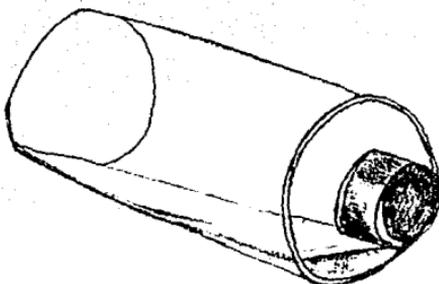


FIGURA 5.- SISTEMA DE CULTIVO CELULAR TIPO "ROLLER".



Otros métodos que se han desarrollado para el cultivo de células adherentes o ancladas, en busca de una mayor relación superficie a volumen de cultivo (S/V), se muestran en la Figura 6, todos ellos presentan valores mayores de S/V, comparados con el sistema "Roller".

El propagador múltiple, la película espiral, las bolsas de plástico y el Gyrogen con tubos, son de uso limitado para el cultivo de células a gran escala, puesto que sus valores de la relación superficie a volumen son demasiado pequeños.

El propagador con camas de vidrio no es práctico a gran escala, pues las esferas de vidrio que se usan como camas pueden moverse y chocar entre sí, debido a la velocidad de circulación del medio necesaria para una aeración adecuada a escalas mayores, lo que ocasionaría daño a las células (Glacken M.W., 1983).

Otras desventajas que presentan estos métodos son:

- a) Dificultad para la toma de muestras representativas durante el proceso.
- b) Potencial limitado para el registro y el control del sistema.
- c) Dificultad para mantener condiciones medioambientales homogéneas a través de todo el cultivo (Reuveny S., 1986).

Los mejores métodos a gran escala para el cultivo de células animales ancladas son: los capilares artificiales, la película espiral tubular de Jensen IL40 y el procedimiento de los microacarreadores en suspensión, ya que estos son los sistemas que presentan una mayor relación de superficie de crecimiento por volumen de cultivo (S/V) y la factibilidad de escalamiento (Glacken M.W., 1983).

VIII.2 Sistema IL40 de la película espiral tubular de Jensen.

En el sistema IL40 de la película espiral tubular de Jensen, consiste de un tubo o manguera de un material permeable a los gases, donde las células crecen adheridas a la superficie interna, son bañadas continuamente con el medio de cultivo que las nutre, el cual fluye constantemente en el interior del tubo, y reciben el oxígeno por difusión a través de la película que les sirve de sustrato (Glacken M.W., 1983).



BOLSAS DE PLASTICO

S/V= 5.0



PROPAGADOR MULTIPLE

S/V= 1.7



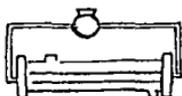
PELICULA EN
ESPIRAL

S/V= 4.0



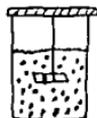
PROPAGADOR EN CAMAS
DE VIDRIO

S/V= 10.0



CAPILARES ARTIFICIALES

S/V= 30.7



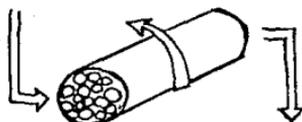
MICROCARREADORES
EN SUSPENSION

S/V= 122 (20 g/l)
153 (25 g/l)



PELICULA ESPIRAL TUBULAR DE JENSEN

IL410
S/V= 9.4



"GYROGEN" CON TUBOS

S/V= 1.2

FIGURA 6 METODOS UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE CELULAS ANCLADAS A UN SOPORTE (S/V= PROPORCION DE SUPERFICIE DE CULTIVO POR VOLUMEN DEL REACTOR).

Este sistema IL40 posee una relación demasiado baja de S/V, respecto a la que ofrecen otros sistemas como el de los capilares artificiales, o el de los microacarreadores en suspensión, lo cual significa un mayor costo del producto. En forma adicional posee otras desventajas entre ellas : la imposibilidad de la toma de muestras representativas, la formación de gradientes a lo largo de la espiral, ya que las células tomarán el oxígeno y los nutrientes al principio de la espiral. Gradualmente los desechos y el bióxido de carbono se irán acumulando en el medio conforme éste fluye hacia el final, donde las células prácticamente ya no recibirán ni nutrientes ni oxígeno.

VIII.3 Fibras huecas o capilares artificiales.

Los sistemas de fibras huecas simulan la estructura y función de los capilares en el sistema circulatorio de los mamíferos. Estos consisten de materiales membranosos semi-permeables y porosos colocados en el interior de unos tubos delgados (de alrededor de 200 μm), abiertos por ambos extremos. A su vez, miles de estos tubos capilares se encuentran arreglados dentro de un cilindro más grande de plástico.

Cada fabricante emplea fibras de diferente composición y geometría, pero la mayoría las acomoda, de tal manera que parecen un pequeño paquete de elementos ópticos fibrosos en un cable. Las fibras pueden ser anisotrópicas, con poros de ultrafiltración en la cara interna y poros más amplios en la superficie exterior; o isotrópicas, con microporos en toda su estructura.

Existen capilares artificiales de diferentes materiales y con cubiertas especiales para favorecer la adhesión celular.

Las células se adhieren sobre la superficie exterior de las fibras, proliferando en el espacio extracapilar, donde alcanzan densidades similares a las de un tejido. El medio de cultivo oxigenado se bombea a través del cartucho proporcionando la nutrición a las células, las cuales intercambian nutrientes y desechos metabólicos a través de las fibras, a semejanza de como lo hacen las células in vivo atravesando las paredes de los vasos capilares y de los riñones.

Los cultivos celulares en fibras huecas tienden a tener grandes productividades de productos de secreción, ello se relaciona teóricamente con una alta velocidad de secreción

provocada por la proximidad célula a célula que se obtiene en estos sistemas. Los sistemas Vitafibers de Amicon, consisten de fibras de copolímeros acrílicos, o de polisulfona en un cartucho cilíndrico que permiten alcanzar densidades celulares de 10^6 a 10^7 células/ml. Este valor es por lo menos un orden de magnitud superior a la lograda en los cultivos con microacarreadores, de acuerdo a esta compañía. Otro fabricante Setec (Livermore, CA.) ofrece el sistema Tricentric, con el cual se pronostican densidades celulares de 10^5 células/ml y presentan altas capacidades de transferencia de oxígeno.

No obstante, los cultivos en capilares artificiales son sumamente vulnerables a cualquier ruptura de la asepsia, pues la mayoría de los fabricantes rechazan el uso de antibióticos y, a diferencia de los tanques de fermentación de acero o bio-reactores de vidrio utilizados en otros sistemas, los cartuchos de plástico de los capilares artificiales no toleran las corrientes de vapor, o dosis de compuestos químicos drásticos. Sin embargo, el sistema Tricentric puede esterilizarse con vapor aproximadamente diez veces, o limpiarse con solventes, pero los demás son desechables, o deben esterilizarse por radiación o atmósferas de óxido de etileno y dado que sólo algunos laboratorios cuentan con ese equipo, se incrementan notablemente los costos (Knight P., 1989).

El sistema de capilares artificiales, además tiene otras desventajas: su operación es compleja, sus posibilidades de escalamiento inciertas y aunque permite un control bastante bueno del proceso, éste se fundamenta en valores promedio de los gradientes internos a lo largo del cartucho de variables como pH, oxígeno, concentración de nutrientes y desechos metabólicos (Kearns M.J., 1990). Además no pueden tomarse muestras representativas, ni observar el aspecto celular microscópicamente durante todo el proceso.

Un diagrama del sistema de capilares artificiales puede observarse en la Figura 7, donde se muestra la disposición de las fibras en el interior de un bioreactor con flujo radial en el que se alcanzaron densidades celulares de 7.3×10^6 células/cm² (Tharakan P.J., 1986).

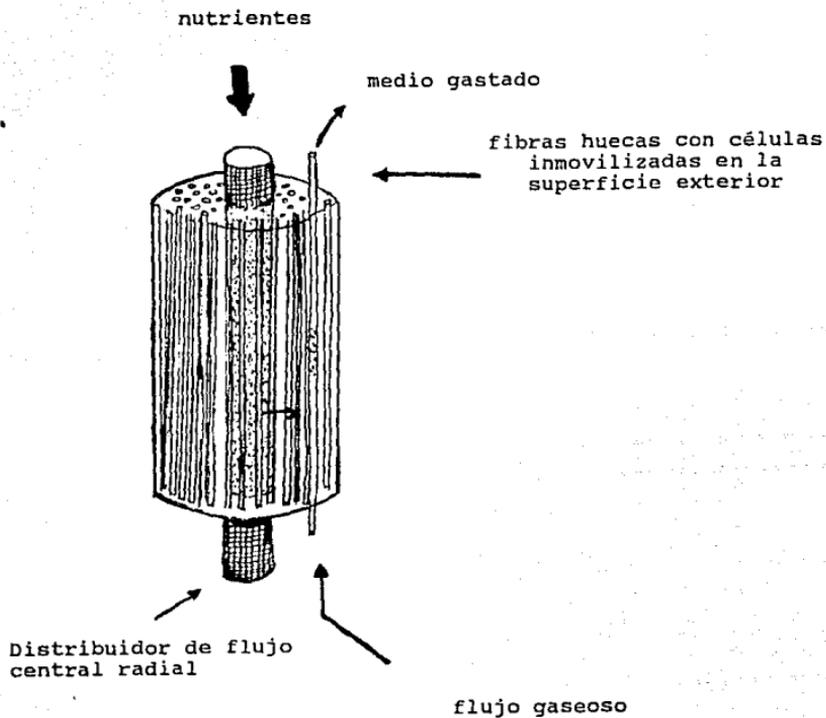


FIGURA 7 DISEÑO DE UN BIO-REACTOR DE CAPILARES ARTIFICIALES CON FLUJO RADIAL (Tharakan P.J., 1986)

VIII.4 Matrices de cerámica.

Las matrices están hechas de un material rígido que proporciona un área extensa para la adhesión y crecimiento celular, en un volumen relativamente pequeño. Como se muestra en la Figura 8, la cerámica tiene la forma de un cilindro con múltiples canales uniformes de forma cuadrada, los cuales corren a lo largo de su eje mayor. Existen matrices de diversos materiales lo que permite una gran versatilidad en su utilización, pues adaptable tanto a células que crecen ancladas, como a las no-adherentes o no ancladas a un soporte.

La configuración de las matrices de cerámica permite una distribución y crecimiento uniforme de las células, ya que el medio de cultivo fluye continuamente y sin restricciones a través del cilindro de cerámica. Las células que crecen sobre las cuatro paredes internas de los canales son bañadas constantemente con el medio de cultivo, que se acondiciona en un circuito externo y puede acoplarse a algún sistema computarizado de registro y control preciso para mantener niveles óptimos de O.D., pH y nutrientes.

Los rendimientos celulares y la eficiencia en la utilización del medio es, en forma mínima, equivalente a la que se obtiene mediante otros métodos de cultivo a gran escala (Van Brunt J., 1986). Se han utilizado cerámicas de más de 18 m² de superficie, con una producción celular de más de 1.2×10^{11} células, equivalente a más de 200 botellas "Roller" con una superficie de 850 cm²; bajo las mismas condiciones. Además no se han encontrado límites prácticos para su escalamiento (Van Brunt J., 1986).

El sistema de matrices de cerámica, en comparación con el de los microacarreadores en suspensión y los capilares artificiales presenta las posibilidades de llevar a cabo una cosecha de células muy sencilla, con los procedimientos de rutina, mientras que en los otros dos sistemas, de microacarreadores y los capilares artificiales, la cosecha celular es muy complicada, y representa grandes pérdidas tanto en la cantidad, como en la viabilidad celular (Van Brunt J., 1986).

Las matrices de cerámica tienen una ventaja sobre los capilares artificiales, pues no existen barreras físicas que entorpezcan el intercambio gaseoso y de nutrientes, entre las células y el medio de cultivo acondicionado.

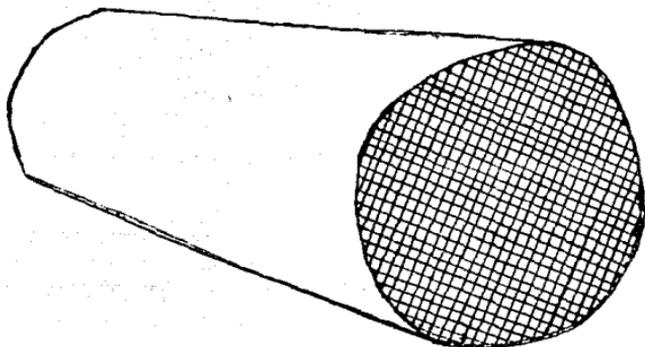


FIGURA 8 DIAGRAMA DE UNA MATRIZ DE CERAMICA PARA EL CULTIVO DE CELULAS ANIMALES A GRAN ESCALA.

La cerámica es un cilindro de canales cuadrados uniformes que lo atraviesan longitudinalmente. Los canales tienen lados de 1.0 mm y paredes de 0.12 mm de espesor, lo cual proporciona 68 canales por cm^2 de área transversal (Lydersen B.K., 1985).

En las matrices de cerámica, las células no están sometidas a la magnitud de la fricción y turbulencias generadas durante la agitación de un sistema como el de los microacarreadores en suspensión (Harakas K., 1984). Sin embargo, dependiendo de la velocidad de flujo del medio, sí existe cierta fricción sobre las células inmovilizadas en la matriz.

VIII.5 Camas fluidizadas.

Este sistema opera mediante la inmovilización de las células en microesferas de aproximadamente 400 μm de una matriz de colágena natural, de aspecto parecido al de la esponja. Las células pueden crecer tanto sobre la superficie, como en las concavidades internas de estas microesferas.

Las microesferas se encuentran suspendidas en un fluido donde se encuentran disueltos los nutrientes y el oxígeno. Se ha diseñado un reactor comercial VERAX para este sistema. Durante la operación del reactor se observan fuerzas de compresión y descompresión y un movimiento de ascenso y descenso de las microesferas en el interior del recipiente cilíndrico. El medio de cultivo circula a lo largo del reactor, a velocidades muy elevadas, de 50 a 100 veces el volumen del reactor por hora. En el interior, el medio de cultivo y la matriz de células inmovilizadas se mezclan hasta conseguir un ambiente uniforme con una eficiente transferencia de masa.

El medio de cultivo se oxigena en un circuito exterior, donde fluye a través de unas membranas de intercambio de gases, conectado a un control computarizado de pH, oxígeno disuelto y temperatura. Los sensores se colocan en la entrada y en la salida del reactor.

Aunque la unidad de producción comercial que emplea este procedimiento tiene una capacidad de 10 l, a nivel experimental ya se han operado reactores de 800 l, en forma continua durante más de tres meses en la obtención de anticuerpos monoclonales (Young W.M., 1987; Van Brunt J., 1986).

El volumen del reactor "Sistema 2,000" (VERAX) es de 24 l, y se reporta que es equivalente a la producción en lote de un bio-reactor, de aproximadamente 80 veces este tamaño (1,920 l).

En un bio-reactor VERAX de 10 l hay más de 10^6 millones de camas y se alcanzan rendimientos de 10^8 células/ml (VERAX, Inc., 1987).

Entre las desventajas de este sistema puede mencionarse que su operación es compleja, aún no existe suficiente información técnica suficiente respecto a su escalamiento (Kearns M.J., 1990), y la que se maneja actualmente es principalmente de tipo publicitario.

VIII.6 Microacarreadores en suspensión.

Este sistema fue propuesto por primera vez por Van Wezel en 1967, como un intento para aumentar la superficie disponible para el crecimiento de las células, respecto al volumen total del cultivo. Esta técnica consiste en la inmovilización de células adherentes o ancladas que crecen formando una monocapa sobre la superficie de pequeñas esferitas de soporte sólido, que miden de 150 a 230 μm de diámetro. Las microesférulas se mantienen en suspensión en el medio de cultivo, mediante una agitación muy suave, para evitar que las fuerzas de fricción, los choques entre las partículas y las turbulencias puedan causar daño a las células.

Los microacarreadores utilizados por Van Wezel, eran de una matriz de dextrana acoplada a grupos cargados dietilaminoetil (DEAE-Sephadex A-50, Pharmacia, Uppsala), pero este sistema no tuvo una aplicación inmediata ya que se observaron efectos tóxicos en las células cuando estos soportes se utilizaban a concentraciones mayores a 2 mg (peso seco)/ml. Investigaciones posteriores permitieron la eliminación parcial de este problema, mediante la reducción de la capacidad de intercambio iónico total de los microacarreadores (Levine D.F., 1977).

Actualmente se encuentran disponibles en el mercado, una gran variedad de microacarreadores que permiten cultivar casi cualquier tipo de célula. Estos soportes están fabricados de materiales como gelatina, dextrana, poliestireno y poliacrilamida, otros son del tipo compuesto, es decir, con una matriz de los compuestos anteriores pero con un recubrimiento de otra substancia que facilite la adhesión celular, como la agarosa o el colágeno principalmente.

Otras características importantes en la selección de las microesférulas son la densidad y la elasticidad: La densidad porque aquéllos más pesados se separarán más fácilmente del medio de cultivo sedimentándose rápidamente, pero requieren de una mayor velocidad de agitación para mantenerlos en suspensión y la elasticidad ya que permite amortiguar los choques entre las microesférulas debidas a las fuerzas de fricción creadas durante la agitación del sistema (Miller A.O.A., 1989).

Algunos resultados confirman que la composición de los microportos afecta marcadamente la morfología celular, la cual influye a su vez sobre la organización citoplásmica, el metabolismo y la diferenciación. Estos hallazgos abren nuevos campos de aplicación a los cultivos en microacarreadores, que otros no permiten.

En forma general, cuando se han establecido las reglas para la inoculación adecuada del sistema, los cultivos con un inóculo de 10^5 células/ml de cultivo y con 1 a 5 g/l de microacarreadores, proporcionan rendimientos celulares de 10^6 células/ml en cultivos en lote. En comparación con los sistemas de cultivos estáticos o estacionarios, se obtienen rendimientos celulares de 12 a 15 veces mayores en un periodo aproximado de 10 días y el rendimiento celular por superficie disponible es 5 veces más grande en los sistemas de cultivo de microacarreadores en suspensión (Miller A.O.A., 1989).

Cuando la concentración de microesférulas alcanza valores de 10 a 30 g/l, permite un rendimiento celular de alrededor de 10^7 células/ml.

La posibilidad de que las células crezcan, no sólo en la superficie de las microesférulas, sino también en su interior, eleva los rendimientos a niveles comparables a los de los sistemas con microesferas macroporosas, en bio-reactores de lecho fluidizado, recientemente desarrollados.

Otras ventajas del sistema de cultivo en microacarreadores en suspensión son:

Una relación elevada de superficie/ volumen de cultivo (S/V), la cual puede modificarse aumentando o disminuyendo la concentración de microesférulas. Esto permite la obtención de altos rendimientos celulares y la concentración de sus productos.

La propagación celular se lleva a cabo en un sólo recipiente de alta productividad, en lugar de varias unidades pequeñas, como es el caso de los cultivos estáticos y tipo "Roller", con el consecuente ahorro de espacio y medio de cultivo. Un cultivo en lote alimentado que utiliza menos de 5 l de medio, proporciona rendimientos celulares y virales equivalentes a los que se obtienen de 250 botellas Roux con 25 l de medio (Griffiths B., 1980). En general 1 l de cultivo en microacarreadores en suspensión corresponde a 50 botellas "Roller" (490 cm²/botella) para la misma cepa celular

(Pharmacia Fine Chemicals, 1981). Además el manejo de un sólo recipiente disminuye los riesgos de contaminación alrededor de 50 veces respecto a los sistemas como el "Roller" (Harakas N.K., 1984).

Los costos de mano de obra disminuyen, al reducirse las necesidades de manipulación. Estos son aproximadamente 10 veces menores respecto al sistema "Roller". (Harakas N.K., 1984).

El sistema es homogéneo, por lo cual permite llevar a cabo un registro y control eficaz de los parámetros metabólicos de mayor importancia, entre ellos pH, oxígeno disuelto, temperatura, y la concentración de nutrientes en el medio de cultivo. Consecuentemente facilita la optimización del crecimiento y la productividad celular, así como la reproducibilidad del proceso.

Una característica casi exclusiva de este sistema es la posibilidad de tomar muestras representativas de las células, las cuales pueden observarse microscópicamente, enumerarse y analizarse mediante otras pruebas que se consideren pertinentes.

Los microacarreadores con las células adheridas a su superficie se sedimentan rápidamente cuando se suspende la agitación, lo cual se facilita la cosecha tanto de las células, como de los productos extracelulares.

Existe la posibilidad de fraccionar el cultivo celular, sin necesidad de utilizar enzimas proteolíticas para desprender las células del soporte sobre el cual se encuentran creciendo, como en la mayoría de los demás sistemas.

Los cultivos en microacarreadores pueden llevarse a escalas mayores más fácilmente que otros sistemas, pues una vez que las células se han adherido a los microacarreadores, éstos pueden manejarse en forma similar a los cultivos en suspensión libre en equipos convencionales (fermentadores) que se usan tradicionalmente en los procesos microbianos, con algunas modificaciones, principalmente en los mecanismos de agitación y aeración, con el fin de disminuir las turbulencias y fuerzas de fricción, pero conservando una buena capacidad de transferencia de oxígeno. La gran experiencia que existe desde hace mucho tiempo en los cultivos en suspensión facilita la instalación y el manejo de los cultivos de células en microacarreadores.

No obstante, el cultivo celular en microacarreadores en suspensión también presenta algunas desventajas como las siguientes:

- La cosecha de células es complicada y disminuye la viabilidad de las mismas.

- El inóculo celular depende aún de cultivos en monocapa, pues en general, no es posible realizar el subcultivo directo de las células crecidas sobre los microacarreadores a una escala mayores células en microacarreadores.

- El costo de los microacarreadores es elevado.

- Hay limitaciones en la transferencia de oxígeno, como en la mayoría de los sistemas de cultivo en suspensión (Glacken M.W., 1983).

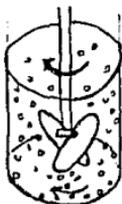
Estas limitaciones para el escalamiento de los cultivos en microacarreadores se han intentado superar mediante el uso de diversos sistemas de agitación y aeración eficientes que provocan pocas turbulencias, entre ellos se puede citar el de Griffiths y Thornston, en 1982, (1) quienes desarrollaron un eje impulsor con la forma similar a la de dos palas enrocadas sobre la flecha principal, formando un ángulo de 30 a 45° de la vertical; o el de Feder y Tolbert, en 1983, (2) que consiste en cuatro láminas flexibles y combeadas, las cuales se extienden hacia el fondo del recipiente de cultivo, o el impulsor de Kedem (3), el cual ha sido adoptado con algunas modificaciones por fabricantes comerciales de como New Brunswick, Inc. Estos diseños pueden observarse en la Figura 9.

Para un bioreactor comercial de New Brunswick, que opera con un eje impulsor similar al tipo ideado por Kedem, se reporta un $K_L a$ de 1.5 a 5.5 l^{-1} , bajo las siguientes condiciones de operación: velocidad del flujo gaseoso 0.625, velocidad de agitación 50 r.p.m. y un volumen total de 5 l (Johnson M., 1990). Además existe una amplia experiencia en este sistema de cultivo en microacarreadores en suspensión, creado desde 1967, lo cual ha permitido el uso de bio-reactores de hasta 1,000 l (Miller A.O.A., 1989).

La eficiencia de adhesión celular a los microacarreadores durante la siembra es menor a la de un cultivo estático en monocapa o "Roller", debido a que las células

deben unirse al soporte estando en movimiento, al momento del choque entre estas partículas y sólo lo lograrán aquellas células que posean una buena membrana y viabilidad lo lograrán. Comparativamente las líneas celulares presentan un 80% de eficiencia al adherirse, respecto a un 100% relativo de estas mismas células; en un cultivo en monocapa en el sistema "Roller" bajo las mismas condiciones. Las células provenientes de tejidos primarios tienen una eficiencia aún menor, de sólo el 50% respecto a las que se adhieren en un cultivo en monocapa, bajo las mismas condiciones (NUNC, 1988).

1.- IMPULSOR DE PALETAS INCLINADAS, TIPO GRIFFITHS Y THORNSTON



2.- IMPULSOR DE FEDER Y TOLBERT



3.- IMPULSOR DE BOMBEO KEDEM



FIGURA Nº 9 ALGUNOS SISTEMAS DE AGITACION DISENADOS PARA LOS CULTIVOS DE MICROACARREADORES EN SUSPENSION (Reuveny S., 1986).

IX.- SELECCION Y COMPARACION DE LOS MEJORES METODOS PARA EL CULTIVO CELULAR A GRAN ESCALA.

De acuerdo a las características descritas previamente, se puede establecer que actualmente los sistemas con mayor potencial, para el cultivo a gran escala de células animales que crecen ancladas, son: los capilares artificiales, la película espiral tubular de Jensen IL40, las matrices de cerámica y los microacarreadores en suspensión, cuyas características más relevantes se comparan en el Cuadro 2.

Como se observa existen muchas ventajas del sistema de cultivo en microacarreadores en suspensión para la producción de grandes cantidades de células adherentes o ancladas, entre las cuales se encuentran, además de las mencionadas con anterioridad, las siguientes:

Las células se encuentran en contacto directo con el medio de cultivo, al igual que en las matrices de cerámica, por lo que se facilita el intercambio de gases y nutrientes, el cual en este caso no depende de la permeabilidad de las membranas del sistema, ni de gradientes de difusión como en los capilares artificiales y la película espiral de Jensen.

Su operación es sencilla cuando se trata de un sistema de cultivo en lote y pueden obtenerse altos rendimientos celulares, similares a los del cultivo en perfusión, siempre y cuando exista una buena transferencia de oxígeno.

Los rendimientos celulares de los cultivos en microacarreadores son comparables a los de las matrices de cerámica, pero menores a los de los capilares artificiales.

Las posibilidades de llevar el sistema de microacarreadores a una escala mayor son buenas, a similitud de la película espiral tubular y los capilares artificiales, y una ventaja respecto a las matrices de cerámica. No obstante las limitaciones de este sistema descritas anteriormente.

De todo lo dicho anteriormente, se desprende que el sistema de cultivo celular sobre microacarreadores en suspensión es uno de los más convenientes a gran escala para las células que crecen ancladas a un soporte y representa un gran avance tecnológico.

CUADRO 2

CUADRO COMPARATIVO DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO A GRAN ESCALA, MAS PROMISORIOS PARA CELULAS DEPENDIENTES DE SUBSTRATO.

Característica	Capilares Artificiales	Película espiral	Matrices de Cerámica	Microacarreadores en suspensión
Proporción S/V	30.7	9.35	-	31-153
Homogeneidad en el cultivo	gradientes	gradientes	?	homógeneo
Control y registro	moderado	moderado	?	excelente
Optimización del proceso.	difícil	difícil	?	excelente
Economía en suero	excelente	moderado	-	excelente
Toma de muestra.	complicada	complicada	complicada	sencilla
Registro del crecimiento celular.	difícil	difícil	difícil	excelente
Observación microscópica	no factible	complicada	no factible	sencilla
Disponibilidad de nutrientes y oxígeno.	indirecta	indirecta	directa	directa
Operación	compleja	-	-	simple* compleja**
Escalamiento	bueno	bueno	información insuficiente	buena
Rendimientos celulares (células/ml)	altos 10^8	medios 6×10^6	altos 5×10^7	medios 6×10^6 * 4×10^7 **
Transferencia de oxígeno	buena	excelente	buena	difícil

* cultivo en lote

** " " perfusión

Sintetizado de Glacken M.W., 1983; Harakas N.K., 1984; Lydersen B.K., 1985; Kearns M.J., 1990.

En general las vacunas antirrábicas elaboradas en cultivos de células han utilizado áquellas que crecen ancladas a un soporte. Sin embargo su aplicación concreta a la producción de una vacuna antirrábica veterinaria debe evaluarse en base la estrategia del proceso, con sus particularidades, por lo cual ésta se describe a continuación.

X.- ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCION DE LA VACUNA.

X.1 .-Procesos preliminares a la producción de la vacuna.

X.1.1.- Selección de la línea celular.

Se propone el uso de la línea celular BHK21 derivada de riñón de hamster (criceto) de un día de nacido, obtenida en marzo de 1961 por MacPherson y Stoker (MacPherson I.A., 1962). Esta línea presenta sensibilidad a un gran número de virus, por lo cual ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios, entre ellos sobre la transformación con el virus poliovirus, la replicación del virus de la fiebre aftosa, arbovirus y el virus de la rabia (ATCC, 1988).

Las células BHK21 son las más sensibles al virus rábico (Kaplan M., 1967), éstas han sido aceptadas por la autoridad de control nacional, representada en México por el Centro Nacional de Salud Animal (CENASA)-SARH, para la producción de vacunas antirrábicas de uso veterinario, pues cubre la mayor parte de los requisitos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), los cuales se enumeran a continuación:

a) El uso de las células debe basarse en un sistema de células semilla, el cual consiste en la obtención de un lote de células derivadas de una fuente de tejido única, que se almacenan en alícuotas en nitrógeno líquido. Una de éstas se usa para la producción de un banco de células de trabajo, que se fracciona y se conserva de igual modo; una porción de este banco se utiliza para cada lote de vacuna.

b) Las células semilla utilizadas para la producción deberán estar registradas y aprobadas por la autoridad de control nacional que corresponda.

c) Debe comprobarse que el banco de células carezca de tumorigenicidad, presente un cariotipo normal durante las dos terceras partes de su tiempo de vida media y que la descripción de sus características morfológicas permitan su identidad.

d) La vacuna tiene que estar libre de otros virus, para lo cual se realizan las pruebas necesarias en células y en animales de laboratorio (dichas pruebas se describen en el capítulo correspondiente al control de calidad).

e) Las células deberán estar libres de micoplasma cultivable y en condiciones de esterilidad (W.H.O., 1984).

Respecto al requerimiento del inciso c, se puede decir que en algunos estudios realizados en animales domésticos y de laboratorio, las células BHK21 han demostrado que carecen de tumorigenicidad, ya que después de doce meses de observación posteriores a la inoculación de una suspensión de 10^7 células con excelente viabilidad, sólo indujeron la formación de tumor mediante la inoculación subcutánea en hamster sirio (Capstick P.B., 1969).

Las células BHK21 también se han producido a mayor escala, en volúmenes superiores a los 2,000 l para la elaboración de vacunas contra la fiebre aftosa y la enfermedad de New Castle (Capstick P.B., 1969). De esta vacuna contra la fiebre aftosa que existe en el mercado desde hace más de veinte años, se han administrado más de cien millones de dosis y hasta la fecha, no se han reportado efectos nocivos atribuibles a la línea celular de la cual proviene (W.H.O., 1987).

X.1.2.- Selección de la cepa viral.

La cepa de virus rábico vacunal que se propone, es la PV, pues es una cepa que cubre todos los requisitos que se enumeran a continuación y es recomendada por la O.M.S. para ser utilizada en la producción de una vacuna antirrábica:

a) El virus rábico vacunal debe pertenecer a una cepa fija plenamente identificada, con un registro histórico, con un periodo de incubación corto, estable y reproducible, la cual no forme corpúsculos de Negri cuando se inocula por vía intracerebral en animales de laboratorio.

b) La utilización del virus vacunal debe fundamentarse en un sistema de virus semilla, el cual consiste en la obtención de un lote de virus semilla maestra que representa cierta cantidad de virus de composición y procesado uniformemente, que se fracciona y conserva en nitrógeno líquido. Una alícuota de éste se usa para la preparación de un lote de virus semilla de trabajo, el cual no debe alejarse más de diez transferencias del lote semilla maestra, una fracción de este último lote es el que se utiliza para la producción de cada lote de vacuna.

c) El comportamiento del virus debe ser uniforme, y producir placas líticas cuando se inocula en sustratos celulares sensibles y producir una respuesta inmune satisfactoria cuando se inocula en los animales de laboratorio.

d) Este virus debe ser neutralizado por un suero antirrábico.

e) La composición antigénica del virus semilla maestra se debe caracterizar ampliamente, mediante anticuerpos monoclonales. Los laboratorios que producen la vacuna están comprometidos a verificar la identidad antigénica de su cepa vacunal periódicamente, o enviarla para este fin a alguno de los Centros de Colaboración de la O.M.S.

f) El lote de virus semilla de trabajo deberá estar libre de otros virus o contaminantes microbiológicos, lo cual se determinará mediante su inoculación en animales de laboratorio, en los sustratos celulares sensibles, y mediante las pruebas de esterilidad necesarias.

g) La cepa viral debe proteger contra las infecciones de virus rábico de calle.

h) Debe ser registrado y aprobado por la autoridad de control nacional (W.H.O. 1984).

La cepa de virus rábico vacunal PV (Pasteur Virus), es una de las más antiguas y conocidas provenientes del Instituto Pasteur, Francia, que además ya ha sido adaptada al cultivo de células BHK21 en ese lugar (Sureau P., 1990). Lo anterior es importante puesto que se disminuye progresivamente el periodo de adsorción del virus a las células, con las transferencias sucesivas y por lo tanto, se incrementan los rendimientos virales. Esta cepa adicionalmente no está sujeta a patentes o exclusividad.

X.1.3.- Selección de los medios de cultivo y del uso de una solución de DEAE-dextran.

Medio de crecimiento para las células BHK21.- Dada la importancia de esta línea celular existe en el mercado un medio optimizado para su desarrollo. Su formulación fina, con caldo triptosa fosfato (CTF) al 10% y suero fetal bovino (SFB) al 10%,

se fundamenta en las recomendaciones de quienes dieron origen a estas células (MacPherson I., 1962), así como en las del Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) para este objetivo (CEPANZO, 1989).

Medio de mantenimiento para las células BHK21, a diferencia del anterior, en él se eliminan las proteínas de origen animal, como SFB, CTF y sustancias como los antibióticos que pueden causar reacciones alérgicas o intolerancia en los animales blanco de la vacuna. Además se eliminan los factores de crecimiento presentes en el suero, pues en esta etapa ya se ha alcanzado una buena densidad celular. Estos compuestos se sustituyen por albúmina bovina al 0.3%.

DEAE-dextran.- Se sugiere el uso del DEAE-dextran a 50 ug/ml diluido en solución amortiguadora de fosfatos o en medio de cultivo, para el tratamiento de las células BHK21, durante 15 a 30 minutos, antes de la inoculación viral, para incrementar la infectividad del virus. Lo anterior se basa en los antecedentes de que este compuesto es un polímero policationico que ha sido utilizado para la introducción de ácidos nucleicos y partículas virales, en distintos cultivos de células animales. No se conoce su mecanismo de acción, pero se cree está relacionado con una modificación de las cargas de la membrana celular al unirse a ésta, y origina una carga iónica favorable a la unión del virus, o bien se une al virus formando un complejo que se adhiere más fácilmente a la misma (Larghi O.P., 1975).

Este compuesto presenta un efecto amplificador de la infectividad de varios virus y parece que confiere a los virus cierta protección contra las nucleasas celulares. Este fenómeno depende el peso molecular (P.M.) de la dextrana utilizada, pero no hay diferencias significativas entre los de un P.M. de 1×10^7 y el estándar de 2×10^6 g mol, de acuerdo con los resultados obtenidos con virus de ARN, como el del polio y los de ADN, como el SV40 (Pagano J.S., 1967).

El DEAE-dextran aumenta la infectividad del virus rábico en células BHK21, cuando se utiliza en concentraciones desde 10 ug/ml, con un efecto máximo a 50 ug/ml sin que ocasione efectos tóxicos en las células, aún cuando éstas permanezcan en contacto con el compuesto por más de una hora (Kaplan M.M., 1967). Estudios posteriores confirmaron que tampoco causa alteraciones en los ácidos nucleicos del virus, ni de la célula (Larghi O.P., 1975).

X.1.4. - Selección del proceso operativo.

Todas las técnicas y procedimientos que se proponen para llevar a cabo el cultivo de células, se basan en los principios básicos que se describen por Freshney R.I. (Freshney R.I., 1983).

Densidad celular.- Este parámetro se determinará durante todo el proceso, mediante la técnica del azul tripán que identifica la viabilidad celular, distinguiendo las células con daños en su membrana (las cuales se observan teñidas) de las sanas (las que permanecen incoloras) (Freshney R.I., 1983). Esta técnica presenta ventajas, respecto a otras como la de Sanford, que determina solamente el número total de células, sean éstas vivas o muertas.

A continuación se describirá el proceso de producción de la vacuna antirrábica, especificando el seguimiento del proceso y las condiciones que se consideran más importantes durante el mismo, así como el control de calidad que debe efectuarse durante y al final de la elaboración de la vacuna. Esta descripción se facilitará siguiendo el diagrama del proceso de producción que se presenta en la Figura 10.

Los procesos iniciales para la producción de la vacuna deben ser:

X.2 La producción de un banco de células madre el cual implica la adquisición de las células BHK21 de una fuente fidedigna, que garantice hayan sido analizadas y caracterizadas de acuerdo a los requisitos que establece la O.M.S. (W.H.O., 1984), descritos previamente en la selección de la línea celular de este trabajo.

X.3 La producción de un lote de células semilla de trabajo, el cual consiste en el subcultivo seriado a partir de un sólo criotubo o ampollita del banco de células madre, hasta obtener la cantidad suficiente de células para la producción de todos los lotes de vacuna durante un mínimo de un año. Esto con la finalidad de asegurar la uniformidad del producto. En este caso por tratarse de una vacuna veterinaria, se considera pueden excluirse las pruebas para comprobar la conservación de las características esenciales de las células madre, descritas por la O.M.S (W.H.O., 1984).

X.4 Obtención de un lote de virus semilla maestra. El virus rábico vacunal cepa PV (Pasteur Virus) debe ser obtenido de una fuente fidedigna y certificado por la O.M.S. de que cubre los requisitos necesarios, para su utilización en la elaboración de una vacuna antirrábica veterinaria. Este constituye el lote de virus semilla maestra, el cual se fracciona en alícuotas pequeñas que se conservan en nitrógeno líquido.

El título de infectividad debe ser superior a $10^{6.5}$ DL50r/ml, porque en el caso de las vacunas antirrábicas veterinarias, el antígeno es relativamente escaso, ya que no se reproduce posteriormente a su inoculación en el paciente, por lo cual es importante que la vacuna contenga una gran cantidad de virus, empleando en su elaboración un lote con un título de infectividad elevado. Habel establece, que un lote de virus semilla de trabajo debe poseer un título mínimo de $10^{6.5}$ DL50r/ml para obtener una vacuna de potencia suficiente (Habel K., 1976).

X.5 Preparación de un lote de virus semilla de trabajo. Una alícuota del lote de virus semilla maestra se inocula en células BHK21 para producir un lote de virus semilla de trabajo, mediante transferencias sucesivas, sin que éstas excedan de 10 (W.H.O., 1984). La cantidad debe ser suficiente para la producción de todos los lotes de vacuna correspondientes durante un año. El título de infectividad de este lote no debe ser menor de $10^{6.5}$ DL50r/ml. La cantidad de virus inoculado por célula o multiplicidad de la infección será de 0.1 a 0.5 DL50r/célula, según recomendaciones de CEPANZO (CEPANZO, 1989).

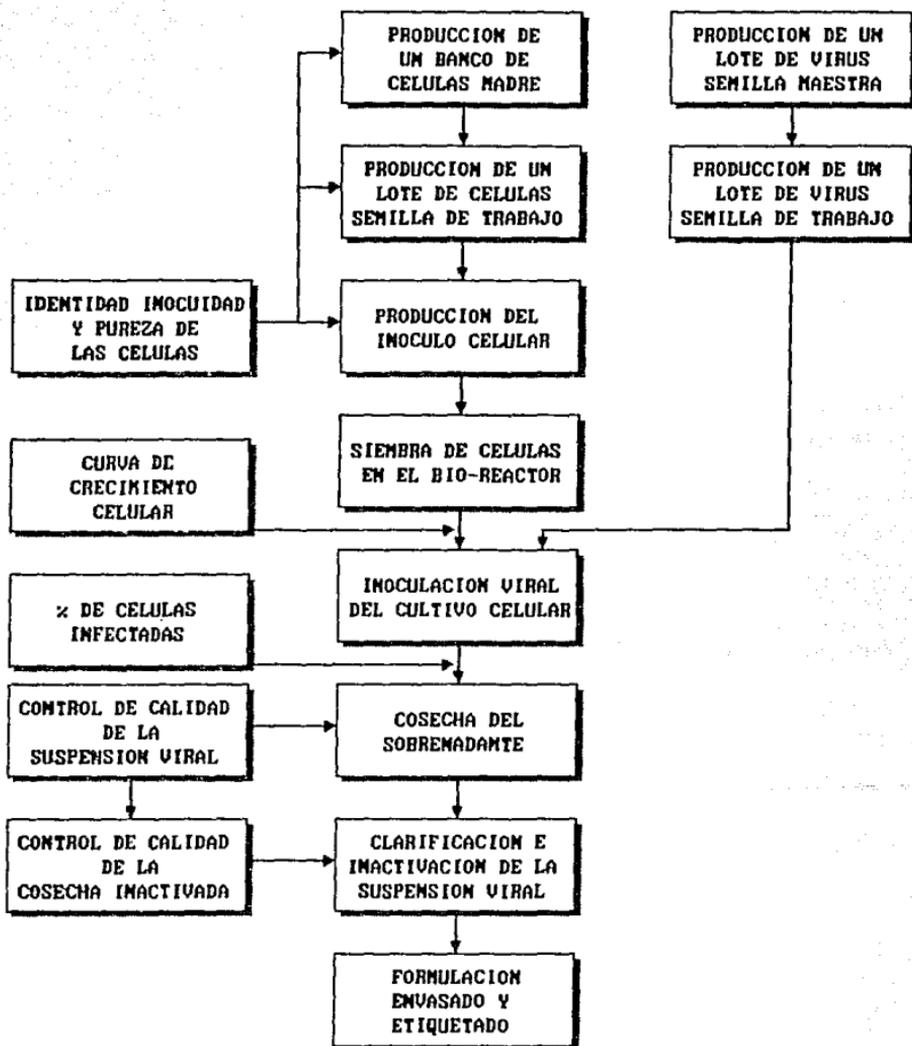
X.6 Primera fase. El cultivo celular.

X.6.1 Producción de las células para la siembra, la cual se realizará de acuerdo a los principios generales de cultivo celular. A partir de una alícuota del lote de células semilla de trabajo, hasta obtener la cantidad suficiente para sembrar con un mínimo de 8 células/cm², de acuerdo a CEPANZO (CEPANZO, 1989), lo cual permita alcanzar la máxima velocidad de duplicación celular con una fase "lag" reducida.

X.6.2 Condiciones durante la fase de crecimiento celular.

a) Se recomienda una temperatura constante de 37 °C, la cual se basa en el rango de temperatura óptimo para el cultivo de células BHK21, de 33 a 37 °C como límite superior (Telling R.C., 1970); pero para el crecimiento celular en general, por su

FIGURA 10 DIAGRAMA DEL PROCESO DE PRODUCCION DE UNA VACUNA ANTIRRABICA DE USO VETERINARIO.



cercanía a las condiciones fisiológicas se establece 37 °C, por lo cual se seleccionó este último valor.

b) Un valor constante de pH 7.4. Esta cifra se encuentra dentro del rango de pH óptimo para el cultivo de células BHK21, que es de 7.2 a 7.6, pero se eligió el más cercano al fisiológico y el más adecuado para el crecimiento celular en general (Freshney R., 1983).

c) Oxígeno disuelto (O.D.) del 40% de saturación del aire, se pretende utilizar esta condición, como punto de partida dado que no existe información bibliográfica específica a este respecto para las células BHK21. Este valor corresponde a un experimento realizado por la compañía New Brunswick (New Brunswick Inc., 1990).

X.6.3 Variables que deben cuantificarse durante el crecimiento celular.

a) Determinación del rendimiento celular, en el número de células viables por mililitro de cultivo (células/ml).

b) Determinación de la eficiencia de la producción celular, medido en el número de células, por mililitro de cultivo por día (células/ml x día).

X.6.4 Determinación del momento de la inoculación viral.
Este se determinará mediante el seguimiento de la curva de crecimiento celular, al momento en que se presente el mayor número de células posible, con una buena viabilidad y en condiciones fisiológicas adecuadas, generalmente en la porción final de la fase exponencial, antes de que disminuya la máxima velocidad de duplicación (Freshney R.I., 1983). Se considera que éste será el mejor momento para la inoculación viral porque, si el virus rábico se replica a expensas de la maquinaria celular, el rendimiento viral será mayor cuando haya más células en buenas condiciones.

X.7 Segunda fase. Replicación viral.

X.7.1 Inóculo viral. Este proviene del lote de virus semilla de trabajo previamente preparado, el cual se utiliza con una multiplicidad de la infección de 0.1 a 0.5 DL50r/célula, de acuerdo a las recomendaciones de CEPANZO (CEPANZO, 1989), ya que

cuando hay un exceso de virus puede presentarse el fenómeno de interferencia, lo cual disminuiría los rendimientos virales (Girard M., 1981), mientras que si la dosis viral resulta demasiado pequeña, sólo serán infectadas parte de las células, dando tiempo a las demás produzcan interferon, y consecuentemente también disminuya la cantidad de virus obtenidos (Atanasiu P., 1984).

X.7.2 Condiciones que se modifican durante la replicación viral.

a) Una temperatura constante de 33 °C, este valor se eligió con base en las recomendaciones de CEPANZO (CEPANZO, 1989) y del rango de temperatura óptimo para la replicación del virus de la rabia, que se reporta es de 33 a 35 °C (Atanasiu P., 1984). Se establece el valor mínimo de este rango, ya que las células se encuentran en mantenimiento durante esta etapa y una menor temperatura contribuye a disminuir, en general, la velocidad de las reacciones metabólicas.

b) Un pH constante de 7.7, porque es el valor medio del rango de pH óptimo para la replicación del virus de la rabia, de 7.6 a 7.8 (Atanasiu P., 1984).

c) La velocidad de agitación u homogenización del sistema de cultivo debe reducirse respecto a la que utiliza durante el crecimiento celular, pues la fase de propagación viral, en general, es más sensible a las fuerzas de fricción y a los choques entre las partículas (Reuveny S., 1986).

X.7.3 Variables que deben cuantificarse durante la fase de replicación viral.

a) Avance en el proceso de infectividad del virus de la rabia. Este se determinará mediante la técnica de diagnóstico de rabia por focos fluorescentes (Dean D.J., 1976), la cual es muy específica, conocida y de amplia aplicación en esta área. A través de este procedimiento se pretende observar de manera objetiva el porcentaje de células infectadas, debido a que no hay efecto citopático visible.

b) Evaluación del rendimiento en la producción viral. Estos se determinarán mediante la valoración del título de infectividad de la cosecha en ratones, la cual se mide en el número de dosis medias letales para ratón por mililitro (DL50r/ml) (Koprowski H., 1976). Esta técnica nos indicará la cantidad de virus que hay en la cosecha, por el efecto in vivo al inocularse por vía intracerebral en los animales.

En forma comparativa, también se realizará el cálculo del efecto de los virus in vitro, a través de la técnica de diagnóstico de rabia por focos fluorescentes, valuado en unidades formadoras de focos fluorescentes por mililitro (UFFF/ml) (Dean D.J., 1976).

c) Valoración de la eficiencia en la producción de virus, la cual se obtiene tomando en cuenta los rendimientos virales en el tiempo que tome este proceso y se cuantifica en DL50r/ml x día y en UFFF/ml x día respectivamente.

X.7.4 Determinación del momento de la cosecha de virus, se hará cuando se presente un 90% de infección viral apreciada a través de la prueba de unidades formadoras de focos fluorescentes, ya que ésta nos indica, en forma indirecta, la cantidad de células que están liberando virus al medio de cultivo, también debe considerarse el aspecto fisiológico de las células, mediante la observación directa al microscopio y se llevará a cabo la cosecha cuando éstas empiecen a deteriorarse.

Otro aspecto a tomar en cuenta es el agotamiento de nutrientes, mediante la cuantificación de la glucosa y la acumulación de los desechos determinando el lactato en el medio de cultivo.

X.8 Tercera fase. Procesamiento del antígeno viral.

Clarificación e inactivación de la cosecha viral. Para esta etapa se seleccionó el proceso aprobado y recomendado por CEPANZO y el Comité Experto en rabia de la O.M.S., la inactivación con el 2-bromoetilamina (BEA) (CEPANZO, 1989; W.H.O., 1984).

Dadas las características de la estrategia de producción, se sugiere que el tipo de agitación para el bio-reactor empleado en la producción de la vacuna antirrábica de uso veterinario sea el tipo Kedem, ya que simultáneamente homogeniza y aerea el sistema, sin provocar turbulencias. Además existen algunos reportes bibliográficos que lo señalan como uno de los diseños más exitosos y con probabilidades de perfeccionamiento (Reuveny R., 1986; New Brunswick Inc., 1990; Johnson M., 1990).

XI. CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad debe realizarse durante todo el proceso de producción de la vacuna, para garantizar un producto puro, inocuo y eficiente.

XI.1 Control de calidad de los insumos. Todos los insumos y reactivos deben ser grado cultivo celular. Los más importantes son, la tripsina (enzima proteolítica usada para la disgregación de las células durante cada subcultivo) y el suero, que al ser sustancias de origen animal, presentan una gran complejidad en su composición y por lo tanto, varían de un lote a otro.

El suero fetal bovino deberá adquirirse con un proveedor autorizado que proporcione las muestras necesarias para seleccionar el mejor lote y garantice el suministro de éste en la cantidad suficiente para la producción de la vacuna antirrábica, durante un año como mínimo.

Antes de su liberación al mercado, el proveedor deberá certificar que el lote de suero se sometió a las pruebas que excluyen la presencia de bacterias, hongos, micoplasmas y virus; así como también a las que demuestran su capacidad para la estimulación del crecimiento celular *in vitro*. No obstante, es conveniente que el suero se analice nuevamente en el laboratorio donde va a utilizarse, mediante las pruebas generales que comprueben su esterilidad (Freshney R., 1983; Gispén R., 1976) y eficacia para el cultivo de células BHK21 específicamente. Los rendimientos se comparan respecto a otro lote de suero patrón, cuyo comportamiento sea conocido con anterioridad.

Al igual que el suero, todos los medios de cultivo y otros insumos deberán someterse a las mismas pruebas de control de calidad antes de su uso.

XI.2 Control de calidad de la vacuna.

El control de calidad sugerido se basa en las reglas que han sido establecidas para las vacunas antirrábicas de uso humano (O.M.S., 1972, W.H.O., 1984, W.H.O., 1987; Netter R., 1976; Habel K., 1976) de éstas, se seleccionan algunas para las vacunas de uso veterinario, a las cuales se les aplica un control

menos estricto, dada la vida media de las especies de importancia económica. Las pruebas básicas son las que se refieren a la pureza, seguridad y esterilidad, sin embargo, el número de ensayos que se emplea para cada una de éstas se reduce.

XI.2.1 Control de la línea celular.

Un 5% de la suspensión celular que se utilizará para la siembra del bio-reactor, se empleará para los cultivos control, los cuales se manipularán igual que las células de producción, pero sin inocularse. Este análisis se realizará nuevamente, antes de que las células de producción sean inoculadas con el virus de la rabia.

Determinación de la presencia de virus citopáticos hemadsorbentes. Algunos cultivos control, se incubarán bajo las mismas condiciones que las células de producción, se mantendrán en observación, por dos semanas de mínimo, durante las cuales no deberán presentarse cambios citopáticos. La morfología deberá conservarse invariable hasta el momento de la inoculación viral, tanto en los cultivos control como en los de producción.

Al final del periodo de observación, un 25% de las células control deberán analizarse utilizando como marcador, eritrocitos de cuyo, los cuales determinarán virus hemadsorbentes (Netter R. 1976).

La identidad de las células, se determinará periódicamente, mediante la determinación del cariotipo (Freshney R., 1983), el cual se analizará con los criterios que establece la O.M.S (O.M.S., 1972).

Control de la línea celular después de la cosecha viral. Después que se ha efectuado la cosecha del virus de producción, se colecta el fluido sobrenadante de los cultivos celulares control, en el cual se verifican los análisis que comprueben la ausencia de virus, mediante su inoculación en animales de laboratorio y en cultivos celulares sensibles, como las de células diploides humanas, o primarias de riñon de mono (Netter R., 1976). También se comprueba en este fluido la esterilidad bacteriana y micótica (Freshney R., 1983; Gispen R. 1976).

La ausencia de micoplasma se debe verificar periódicamente, para lo cual se recomienda la técnica de Chen, porque es una de las más sencillas (Chen T.R., 1977).

XI.2.2 Control de calidad de la suspensión viral.

El título de infectividad del virus de la rabia, se determinará in vivo mediante su inoculación en ratones (Netter R., 1976) e in vitro en unidades formadoras de focos fluorescentes (Dean D.J., 1976). El título del fluido viral que va a utilizarse en la producción de una vacuna antirrábica inactivada, debe ser mayor o igual a, 10^7 DL50r/dosis, o 10^9 UFFF/dosis, como condición para que la vacuna alcance la potencia mínima requerida de 1 Unidad Internacional de protección por dosis (U.I./dosis) (Sureau P., 1990; Habel K., 1976).

Análisis de pureza e identidad del virus de la rabia.

Se deben efectuar pruebas en animales, inoculando una fracción de la suspensión viral en ratones lactantes y adultos, cobayos y conejos, según las especificaciones. Asimismo se deben realizar otras en cultivos celulares, por ejemplo, en células renales primarias de conejo (Netter R., 1976).

Nuevamente en esta etapa, se verifican las condiciones de esterilidad (Freshney R., 1983; Gispen R., 1976) y la ausencia de micoplasma (Chen T.R., 1977).

XI.2.3 Control de calidad de la cosecha viral, después de la clarificación y la inactivación.

Determinación de la curva de inactivación y ausencia de virus vivo residual. Por razones de seguridad, a intervalos regulares de tiempo debe verificarse nuevamente la curva de inactivación del virus, mediante la titulación de la cosecha inactivada, en ratones lactantes y adultos (Netter R., 1976); así como también la inoculación en cultivos de células BHK21 de un lote celular diferente al de producción, en las cuales se determinen las UFFF (Dean D.J., 1976), con el fin de comprobar que no quede ningún virus vivo. El tiempo total de la inactivación del virus debe ser, por lo menos, el doble del tiempo requerido para que no quede ningún virus vivo residual (Habel K., 1976).

Pruebas para comprobar la ausencia de otros virus extraños, o contaminantes de la vacuna, en cultivos celulares, por ejemplo, en células renales primarias de conejo, donde se verifica la ausencia de citopatogenicidad y el correspondiente a los virus hemadsorbentes (Netter R., 1976).

XI.2.4 Control de calidad del lote final de vacuna.

Potencia de la vacuna.

La evaluación más importante y final de cada lote de vacuna antirrábica corresponde a la prueba de potencia del National Institute of Health (NIH) (Seligmann E.B. Jr., 1976), la cual establece la protección que la vacuna es capaz de ofrecer a los animales vacunados contra un virus rábico de desafío. La potencia está relacionada con la cantidad y calidad de los virus inactivados contenidos en la vacuna, es de aplicación rutinaria y un requisito de cada lote de vacuna, para que ésta pueda salir al mercado (W.H.O., 1988).

Análisis de estabilidad de la vacuna.- La estabilidad de la vacuna se demuestra mediante la conservación de la potencia, hasta el momento de su empleo. Con este propósito los laboratorios deben producir vacunas con una potencia superior a 1.0 U.I./dosis el día de su elaboración, la cual debe conservarse por un periodo mínimo de seis meses bajo las condiciones adecuadas de almacenamiento (de +2 a +8 °C) y durante más de un mes a 37 °C. (W.H.O., 1984; W.H.O., 1988).

Las vacunas inactivadas son relativamente estables, si se almacenan en las condiciones adecuadas, pero este análisis es particularmente importante en los países tropicales, debido a las condiciones climáticas de éstos (W.H.O., 1984; Atanasiu P., 1984).

Pruebas de seguridad.- Se recomienda que todas las vacunas antirrábicas deberán someterse a las pruebas de seguridad, mediante inoculación directa en las especies blanco, para ello, deben seguirse cuidadosamente las indicaciones de las mismas (Kaplan M., 1976; W.H.O., 1984).

Asimismo, deben efectuarse nuevamente las correspondientes a esterilidad.

XII.- DISCUSION.

Las vacunas antirrábicas producidas en cultivos de células son las más eficientes e inocuas de las que existen a la fecha, pues son las únicas que no provocan problemas neurológicos postvacunales, son más homogéneas y pueden producirse a gran escala. Lo anterior hace que esta clase de vacunas sean la mejor opción, como uno de los medios principales para la prevención y control de la rabia en nuestro país, a través de un abasto suficiente para las campañas antirrábicas nacionales, que demandan tan sólo para la rabia canina de un promedio de 8'000,000 de dosis por año. Un aumento en la producción de las vacunas antirrábicas veterinarias producidas en células, aunada a una eliminación de todos los perros callejeros o sin dueño, que no sean vacunados, son partes esenciales de un programa de control eficaz contra esta zoonosis.

La producción de las vacunas antirrábicas veterinarias a una mayor escala, por parte del sector público y/o paraestatal, tendría grandes ventajas para el país, entre ellas:

a) Se aseguraría el suministro de un producto uniforme y en la cantidad suficiente para cubrir las necesidades nacionales, en lugar de un suministro irregular e insuficiente como el actual.

b) Se reduciría el intermediarismo, pues la fabricación directa de estas vacunas por parte del sector público favorecería la autosuficiencia de estos productos para la realización de las campañas antirrábicas evitando las compras a terceros de la iniciativa privada.

c) El cultivo de células a altas densidades para la producción de la vacuna, reduciría el costo de la misma, mediante la utilización más eficiente del medio de cultivo y la concentración del virus de la rabia en el sobrenadante, con lo cual se evitarían o reducirían los procesos de purificación del producto.

Una de las desventajas de las vacunas antirrábicas producidas en células es su costo elevado, el cual puede combatirse incrementando la escala y eficiencia de los métodos de producción. En México los métodos más comunes aún son el del cultivo estático en monocapa y el sistema de botellas giratorias o "Roller", los cuales resultan con bajos rendimientos (pequeña relación S/V), con heterogeneidad en la producción, altos riesgos

de contaminación e intenso trabajo manual (múltiples unidades de trabajo), sin registro o control del proceso (excepto la temperatura); todo ello a pesar de que existen a nivel mundial nuevos y mejores métodos para el cultivo de células a gran escala, entre los cuales sobresale el sistema de microacarreadores en suspensión.

El sistema de microacarreadores en suspensión comparativamente representa un gran avance biotecnológico, ya que permite aumentar la producción y simultáneamente disminuye las probabilidades de contaminación y el trabajo intensivo, con el uso de bio-reactores de mayor capacidad en los que se puede llevar a cabo un cultivo más homogéneo en una sola unidad de trabajo y bajo condiciones controladas. Por otra parte, las expectativas de rendimiento y eficiencia a mediano plazo bien valen la pena.

El sistema de microacarreadores en suspensión es actualmente la mejor opción para el cultivo a gran escala de células ancladas a un soporte y por lo tanto para la producción de una vacuna antirrábica de uso veterinario, en la cual de manera tradicional, siempre se han utilizado esta clase de células.

La estrategia experimental que se propone para la producción de la vacuna antirrábica veterinaria, permite una mayor objetividad en la evaluación del sistema de cultivo celular para este proceso. Además complementado con el control de calidad correspondiente garantiza un producto final inocuo y eficiente.

La estrategia para la producción de una vacuna antirrábica veterinaria que aquí se plantea, presenta varias características particulares, por las cuales el sistema de microacarreadores resulta la mejor opción:

Durante la fase de crecimiento celular es indispensable la toma de muestras representativas y la observación microscópica de las células, para conocer su estado fisiológico, viabilidad, estabilidad genética y verificar la ausencia de virus adventicios, mediante las técnicas señaladas en la estrategia experimental de producción.

La cuantificación de la densidad celular durante el proceso es muy importante, ya que permitirá determinar la curva de crecimiento y el momento más adecuado para la inoculación viral; mientras que en otros sistemas la densidad celular se determina solamente de manera indirecta a través de la cuantificación de la glucosa o el ácido láctico.

Dadas las características del virus rábico, que no causa efectos citopáticos evidentes, es necesario registrar el avance de la infección en el cultivo, mediante el análisis de muestras representativas, durante todo el proceso de la replicación viral.

Un virus rábico fijo vacunal debe tener un registro exacto del número de transferencias o pases en células, o en animales huéspedes, con el objetivo de verificar periódicamente su estabilidad genética por razones de seguridad. Este registro se facilita en un cultivo homogéneo y en lote, en el cual se cuantifique exactamente el número de días posteriores a la infección viral, lo cual puede lograrse en un cultivo en microacarreadores en suspensión operado en lote.

El cultivo de células BHK21 en microacarreadores en suspensión para la producción de una vacuna antirrábica de uso veterinario permitirá una separación sencilla de las células crecidas en la superficie de las microesférulas del fluido, las cuales se sedimentan fácilmente por gravedad, con lo cual se simplifican algunas fases del proceso como, el tratamiento de las células con DEAE-dextrán, la inoculación y la cosecha viral, con el consecuente ahorro de tiempo y dinero que se invertirían en estas operaciones.

Es el único sistema que permite la determinación objetiva del momento de la inoculación, así como de la cosecha viral, a través del análisis continuo del proceso, descrito en la estrategia de producción, con lo cual se garantiza un proceso reproducible.

La existencia en el mercado de una gran diversidad de microacarreadores proporciona una mayor oportunidad de seleccionar el tipo de recubrimiento en el que las células produzcan la mayor cantidad de virus rábico, así como la de aquellos que permitan el subcultivo directo mediante transferencias sucesivas a una mayor escala.

Por otra parte, las experiencias que se han tenido en forma reciente en la producción de la vacuna antirrábica de uso humano elaborada en células VERO cultivadas sobre microacarreadores en suspensión en bio-reactores de hasta 500 l., por Rhône-Mérieux, Francia, con la cual se ha logrado reducir el costo de este tipo de vacunas. La producción de una vacuna antirrábica de uso veterinario elaborada en células BHK21 cultivadas en el mismo sistema, representa una gran posibilidad de abatir costos e incrementar la eficiencia, pues las células BHK21 son incluso más sensibles al virus de la rabia que las células VERO.

Además se reportan buenos rendimientos virales obtenidos mediante este sistema de cultivo a gran escala de células sobre microacarreadores en suspensión, entre ellos, el virus Polio en bio-reactores de 1000 l., de la poliomielitis en 625 l., de la fiebre aftosa en 235 l. y Herpes en 10 l. Otro de los productos elaborado mediante el mismo sistema es el interferón fibroblástico humano en escalas de 14 a 50 l. (Reuveny S., 1986).

El modo de operación del sistema que se considera más adecuado para la producción de la vacuna antirrábica veterinaria es en lote, pues como ya se estableció anteriormente es una manera de controlar el número de pases o transferencias del virus de la rabia en las células huésped. Adicionalmente la implantación de un sistema operado en perfusión requiere de una tecnología establecida y optimizada y su costo es mucho más elevado que el de la operación en lote.

La siembra de un bio-reactor a gran escala depende del suministro de células provenientes de cultivos de menor tamaño, lo cual puede resultar un problema en el caso del sistema de microacarreadores en suspensión, de acuerdo a lo expuesto anteriormente. Sin embargo, las nuevas combinaciones de materiales de estos microsoportes, abren la perspectiva de lograr un subcultivo directo utilizando áquellos con recubrimiento de colágeno o gelatina, en los cuales las células pueden desprenderse fácilmente al degradarse las proteínas de estos recubrimientos, sin necesidad de sufrir un ataque enzimático como el de la tripsina y unirse nuevamente a los nuevos microacarreadores en el bio-reactor de mayor capacidad.

Otra forma de enfrentar este problema del subcultivo sería a través del uso del sistema de matrices de cerámica, donde las células pueden desprenderse enzimáticamente sin que éstas pierdan viabilidad, pueden alcanzarse buenos rendimientos celulares y presentan una buena transferencia de oxígeno. Una última opción, aunque menos recomendable, pero sí más económica, resultaría el uso de charolas múltiples tipo "Cell Factory" (NUNC), que es un sistema de cultivo cerrado y estático en monocapa, que reduce enormemente las posibilidades de contaminación, el manejo y espacio requerido, respecto al uso de las botellas tradicionales, mediante el empleo de unidades de trabajo de mayor capacidad con solamente dos aberturas al exterior.

Hasta el momento se ha realizado una descripción y una evaluación comparativa de los diferentes sistemas de cultivo para células animales ancladas, desde los más sencillos y antiguos, hasta los más modernos y sofisticados. Sin embargo, tratándose de

la aplicación en México de un sistema de producción a gran escala que incrementa el número de dosis de vacuna antirrábica de uso veterinario, e intentando que éstas resulten más económicas y eficientes que las actuales. La comparación más concreta debe ser respecto a las botellas giratorias "Roller" de uso tradicional en la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE-SARH), así como en otras instituciones nacionales e internacionales de asesoría, como el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO-OMS) en Argentina, donde podría llevarse a cabo la implantación de una nueva tecnología.

Los datos reportados bibliográficamente y discutidos anteriormente en la descripción de los sistemas "Roller" y microacarreadores en suspensión, sirven como base para hacer a continuación una estimación a grosso modo del ahorro que representaría el uso de este último sistema:

a) Si la relación S/V es de 5.0 para el sistema "Roller" y de 122.0 para el sistema de microacarreadores en suspensión, usando 20 g/l de microsoportes en un cultivo en lote, significa un gasto de medio de cultivo y suero 25 veces menor, o sea un ahorro del 96%.

b) Los riegos de contaminación que se reporta son 50 veces menores en el sistema de microacarreadores que en el sistema "Roller", lo cual equivale a un ahorro probable de medio de cultivo y células del 98%.

c) La mano de obra es 10 veces menor para el cultivo en microacarreadores en suspensión y por lo tanto representa un ahorro de 90% en este rubro. Estas cifras son bastante elevadas y dan una idea de la diferencia en eficiencia de estos dos sistemas de cultivo; claro está que deben estimarse otros conceptos que reducirán estas cifras, tales como la instalación y el mantenimiento del sistema de microacarreadores en suspensión que es más caro. Sin embargo resulta obvio que estas cifras difícilmente se igualan.

Por otro lado hay ventajas que a priori no pueden estimarse económicamente, pero que seguramente serán muy significativas, entre ellas: además de la superficie disponible para el crecimiento celular, qué tanto se incrementarán los rendimientos de células BKH21 al encontrarse en un medio-ambiente controlado? (se reporta que de manera general es 5 veces mayor para los cultivos en microacarreadores en suspensión). Cómo influirán las mejores condiciones fisiológicas en las que se encuentran las células en el incremento de los rendimientos virales?.

Eventualmente y dadas las necesidades de otros países de Latinoamérica y en vías de desarrollo, pudiera contemplarse la posibilidad de la exportación de este tipo de vacunas y de la transferencia de tecnología de las mismas, con el fin de contribuir de alguna manera al control de la rabia en áreas como la India, donde parece increíble que esta zoonosis aún cobre tantas vidas humanas debido a la carencia de una vacuna veterinaria eficiente y económica, así como de intensas y extensas campañas de vacunación que han resultado tan exitosas en países desarrollados.

XIII.- CONCLUSIONES.

1.- Dado que la rabia es un problema de zoonosis vigente, que causa mortalidad de seres humanos y grandes pérdidas económicas en México y en los países en vías de desarrollo; y de que existe un déficit en la producción nacional, a nivel del sector público, para atender la demanda de vacuna antirrábica canina y contra el derriengue bovino, se hace evidente la necesidad de incrementar en el número de dosis de vacunas antirrábicas veterinarias que se producen actualmente, para satisfacer la demanda de las campañas de vacunación nacional contra la rabia canina y el derriengue bovino, para lo cual se propone elevar la producción de las vacunas antirrábicas veterinarias elaboradas en cultivos celulares, utilizando el sistema de microacarreadores en suspensión, el cual presenta características que son particularmente importantes durante las diferentes etapas de su elaboración.

2.- Una evaluación detallada de las ventajas y desventajas del cultivo celular en microacarreadores en suspensión, permite preveer que no obstante, la puesta en marcha de este sistema requiere de una inversión significativa, los resultados estimados a corto y mediano plazo, justifican plenamente su establecimiento.

3.- Si bien, el método de cultivo celular empleado en la producción de la vacuna antirrábica es muy importante, también lo es el planteamiento de una estrategia de trabajo organizada y un control de calidad estricto y escrupuloso que garanticen un producto final óptimo.

IX. BIBLIOGRAFIA

Acha P.N., Arambulo P.V. (1985)

Rabies in the Tropics - history and current status-
In: Kuwert E., Mérieux C., Koprowski H., Bogël K. eds.
Rabies in the Tropics, Berlin:Springer - Verlag,
p. 343-359.

Aguilar Setián A., Pastoret P.P., Oros D. y Kretschmer(1986)

Anticuerpos monoclonales en rabia. En: Garza R.J. y
Franco de Guzmán G.,eds. Avances en el uso de vacunas
1885-1985. México: Secretaria de Salud, p. 124-133.

Atanasiu P. (1984)

Curso Internacional de Control de Vacunas Virales.
(Conferencias). México, S.S.A.-O.P.S. 200 p.p.

A.T.C.C. (1988)

Catalogue of Cell Lines & Hibridomas. 6th. edition,
Maryland, American Type Culture Collection.
p. 9.

Baer M.G. (1975)

Bovine paralytic rabies and rabies in vampire-bats. In:
Baer G.M., Ed. The natural history of rabies. Vol.2.
New York: Academic Press, 155-175.

Baer M.G. (1988)

Research towards Rabies Prevention: Overview. Rev.Inf.
Dis.:10, supplement 4. nov. dec: S576-578.

Capstick P.B., Telling R.C. and Garland A.J.M. (1969)

Utilization and Control of BHK Cells in Inactivated Foot-and-Mouth Disease Vaccine Production. Prog. Immunobiol. Standard; 3: 131-135.

CEPANZO (1988)

Reunión Interamericana para aprobar una vacuna antirrábica de referencia como patrón regional. Informe Final. Buenos Aires, CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS (O.P.S.-O.M.S.). 6 p.p.

CEPANZO (1989)

Curso de producción y control de vacunas antirrábicas. Buenos Aires, CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS (O.P.S. - O.M.S.) 20 p.p.

CONAFRUT-SARH (1983)

Propagación de plantas por cultivo de tejidos. México Comisión Nacional de Fruticultura (CONAFRUT), Subdir. de Investigación y Docencia. Depto. de Fitoproducción. 50 p.

Chen T.R. (1977)

In situ detection of Mycoplasma Contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. Experimental Cell Research; 104: 255-264.

Danes S.B., Broadfoot M.M. and Paul J. (1963).

Exp. Cell. Res. 30: 369.

Dean D.J. y Abelseth M.K. (1976)

Prueba de Anticuerpos Fluorescentes. En: Kaplan M.M. y Koprowski H., eds. La Rabia, técnicas de laboratorio. 3ª ed. Ginebra, O.M.S. p-75

Debbie J.G., (1988)

La rabia: Un viejo enemigo al que podemos derrotar.
Foro Mundial de la Salud. Vol. 9, 550-555.
Organización Mundial de la Salud (O.M.S.).

Escobar C.E. (1988)

Program for the Elimination of Urban Rabies in Latin
America. Rev. Inf. Dis. 10 (supplement 4): S689-691.

Familletti P.C. and Fredericks J.E. (1988)

Techniques for Mammalian Cell Immobilization.
Biotechnology: 6 (January): 41-44.

Freshney R.I. (1983)

Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique.
New York, Alan R. Liss, Inc. 286 p.p.

Gispen R. (1976)

Pruebas de la vacuna liofilizada. Prueba de esterilidad
En: Kaplan M.M. y Koprowski H., eds. La Rabia, técnicas
de laboratorio. 3ª ed. Ginebra, O.P.S. p. 239

Girard M. et Hirth L. (1981)

Virologie Générale et Moléculaire. 2ª tirage. Paris,
Doin Editeurs p. 166, 177-174.

Glacken M.W., Fleischaker R.J. and Sinskey A.J. (1983)

Mammalian Cell Culture: Engineering principles and
scale up. Trends in Biotech. 1: (4) 102-108.

Guidolin R. y col. (1983)

Produção da vacina anti-rábica veterinária em
Suspensão de células BHK. Rev. Microbiol., São Paulo,
14(1): 27-35.

Habel K. (1976)

Consideraciones generales sobre las pruebas de inocuidad y potencia. En: Kaplan M.M. y Koprowski H., eds. La Rabia, técnicas de laboratorio. 3ª ed. Ginebra, O.P.S. p.285

Harakas N.K. (1984)

Industrial Mammalian Cell Culture: Physiology-Technology-Products. Annual Reports on Fermentation Process. Vol.2, Chapter 7, Ed.GT.TSAO. Academic Press. New York

Hummeler K. Koprowski H., Wiktor T.J. (1967)

Structure and Development of Rabies Virus in Tissue Culture. Jour. Virol.;1:152-170.

Kado Boll G. (1990)

Director General del Instituto Nacional de Virología. Secretaría de Salud. Comunicación Personal.

Kaplan M.M. et. al. (1967)

Effect of Polyions on the Infectivity of Rabies Virus in Tissue Culture: Construction of a Single-Cycle Growth Curve. Jour. Virol.;1(1):145-151.

Kearns M.J. (1990)

Integrated Design. for Mammalian Cell Culture. Biotechnology: 8 (May):409-418.

Knight M. (1989)

Hollow Fiber Bioreactors for Mammalian Cell Culture. Biotechnology: 7 (May): 459-461.

Koprowski H. (1976)

Prueba de inoculación al ratón. En: Kaplan M.M. y Koprowski H., eds. La Rabia, técnicas de laboratorio. 3ª ed. Ginebra, O.P.S. p. 88-97.

Larghi O.P. et. al. (1975)

Sensitivity of BHK21 Cells Supplemented with Diethylaminoethyl-Dextran for Detection of Street Rabies Virus in Saliva Samples. Jour. Clin. Microbiol.; (3):243-245.

Levine D.L., Wong J.S., Wang D.I.C. and Thilly W.G. , (1977)

Somat. Cell. Genet. 3, 149-155.

Lydersen B.K., et al., (1985)

Ceramic Matrix for Large Scale Animal Cell Culture. Biotechnology 3 (January):63-67.

MacPherson I. and Stoker M. (1962)

Polyoma Transformation of Hamster Cell Clones. An Investigation of Genetic Factors Affecting Cell Competences. Virology; 16: 147-151.

Martin N., et al., (1987)

High Productivity in Mammalian Cell Culture. Biotechnology 5:838-840.

Miller A.O.A., Menozzi F.D. and Dubois D., (1989)

Microbeads and Anchorage-Dependent Eukaryotic Cells: The Beginning of a New Era in Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; 39: 73-95. Ed. A. Fiechter, Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.

Murphy F.A. (1977)

Rabies Pathogenesis. Arch. Virol.; 54:279-297.

Netter R. y Perkins F.T. (1976)

Pruebas de inocuidad propuestas para la vacuna antirrábica inactivada preparada en cultivos celulares
En: Kaplan M.M. y Koprowski H., eds. 3ª ed. Ginebra, O.M.S. p. 363

New Brunswick (1990)

Application Reports in Mammalian Cell Culture.
Compiled by Nicholas Vosper. Edison N.J., New Brunswick Sc. Co., Inc. 23 p.p.

NUNC (1988)

Biosilon Bulletin. Roskilde, Denmark, NUNC-INTERMED
7 p.p.

O.M.S. (1982)

Servicio de Información Técnica. Boletín Nº 486,
Ginebra, ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 30 p.p.

Pagano J.S. and McCutchan J.H. (1969)

Enhancement of Viral Infectivity with DEAE-Dextran:
Application to development of vaccines. Progr. Immunobiol. Standard; 3: 152-158.

Pastoret P.P. et Schwers A. (1984)

Le point sur les maladies virales des animaux domestiques transmissibles à l'homme. SPECTRUM International; 24(4): 1-10.

Pharmacia Fine Chemicals, Inc. (1981)

Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods.
Pharmacia, Uppsala, Sweden. 127 p.p.

Ratafia M. (1987)

Mammalian Cell Culture: Worldwide Activities and Markets. Biotecnology; 5(july): 692-694.

Reuveny S. and Thoma R. W. (1986)

Apparatus and Methodology for Microcarrier Cell Culture. Advances in Applied Microbiology; 31: 139-179.

Roumiantzeff M., Ajjan N., Montagnon B., Vincent-Falquet J.C. (1985)

Rabies vaccines produced in cell culture. Ann. Inst. Pasteur Virol.; 136 E:413-424.

Rupprecht C. E. and Kiény M.P. (1988)

Development of a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. In: Campbell J.B., Charlton K.M. (eds), Rabies. Chapter 15, 335-364. Kluwer Academic Publishers, Boston.

Seligmann E.B. Jr. (1976)

Prueba de Potencia NIH. En: Kaplan M.M. y Koprowski H. eds. La Rabia, técnicas de laboratorio 3ª ed. Ginebra, O.M.S.

Shope R.E. (1984)

Rabies Enigma: Human and Animal Disease Control. In: Applied Virology. New York, Academic Press. 231-238.

Secretaria de Salud (1989)

Aspectos fundamentales para la prevención y control de la rabia y la brucelosis en las entidades federativas del país, durante el periodo 1989-1994. Documento de Trabajo. México, Secretaria de Salud - O.P.S. 92 p.p.

Sureau P. (1988)

History of Rabies: Advances in Research towards Rabies Prevention during the last 30 years. Rev. Inf. Dis. 10 (supplement 4): S581-S584.

Sureau P. (1990)

Comunicación personal. Unidad de la Rabia, Instituto Pasteur. Paris, Francia.

Telling R.C. and Radlett P.J. (1970)

Large-Scale Cultivation of Mammalian Cells. Advances in Applied Microbiology; 13: 91-116.

Tharakan J.P. and Chau P.C. (1985)

A Radial Flow Hollow Fiber Bioreactor for the Large-Scale Culture of Mammalian Cells. Biotechnology and Bioengineering; 18(March): 329-342.

Tierkel E.S. (1975)

Canine Rabies In: Natural History of Rabies. Vol. II, Chapter 8, Baer M. G. Ed. Academic Press, New York.

Tomes, E.H. (1982)

Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture & Industry. Ontario, University of Guelph, 225 p.p.

Van Brunt J. (1986)

Immobilized Mammalian Cells: The gentle way to productivity. Biotechnology; 4(June): 505-510.

VERAX, Inc., (Trade Marck) (1987)

New Products. Biotech. 5; (May): 503.

Vodopija I. (1988)

Current Issues in Human Rabies Immunization. Rev. Inf. Dis.;10, supplement 4; Nov-Dec; S758-S763.

Warrel D.A. and Warrel M.J. (1988)

Human Rabies and Its Prevention: An Overview. Rev. Inf. Dis.;10, supplement 4; Nov-Dec; S726-S731.

W.H.O. (1984)

W.H.O. Expert Committee on Rabies. Seventh Report. World Health Organization (W.H.O.). Technical Report Series No 709. 93 p.p.

W.H.O. (1987)

Acceptability of Cell Substrates for Production of Biologicals. Report of a WHO Study Group. Technical Report Series 747. Geneva, WORLD HEALTH ORGANIZATION.

W.H.O. (1988)

Potency and Stability of Various Modern Rabies Vaccines for Veterinary Use. Rabies Research 88.28 Geneva, WORLD HEALTH ORGANIZATION.

Wiktor T.J. and Clark H.F. (1975)

Growth of Rabies Virus in Cell Culture. In: Baer G.M. ed. The Natural History of Rabies. Vol. 1. New York, Academic Press, Inc.

Wunner W.H., Reagan K. J. and Koprowski H. (1984)

Characterization of Saturable Binding Sites for Rabies Virus. Jour. Virol.;50(3): 691-697.

Wunner W.H. et. al. (1988)

The Molecular Biology of Rabies Viruses. Rev. Inf. Dis.;10, supplement 4;Nov-Dec;S771-S784.

Young W.M. and Robert C.D.Jr. (1987)

Optimization of Mammalian Cell Bioreactors. Materials and Methods. Biotechnology;5:(May):835-837.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

XIV .- LISTA DE ABREVIATURAS

- CENASA.- Centro Nacional de Salud Animal.
- CEPANZO.- Centro Panamericano de Zoonosis.
- DL50ratón/ml. .- Dosis letal media para ratón
- h. - horas.
- k_{1a} .- Coeficiente de transferencia de oxígeno.
- M.O.I.- (Multiplicity of infection) Multiplicidad de la infección.
- NIH .- National Institute of Health.
- O.M.S. - Organización Mundial de la Salud.
- O.P.S. - Organización Panamericana de la Salud.
- P.M. - Peso molecular en gramos.mol.
- r.p.m. - revoluciones por minuto.
- S.A.R.H. - Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos
- SFB .- Suero fetal bovino.
- S.S. .- Secretaria de Salud, antes S.S.A.
- S.S.A. .- Secretaria de Salubridad y Asistencia.
- W.H.O. .- World Health Organization, O.M.S.