



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**
Instituto de Biotecnología

00551

33



300157

**Caracterización de las poblaciones celulares y
del metabolismo en cultivos estáticos de
células hematopoyéticas de sangre de cordón
umbilical humano**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Biól. ALEXANDRA VALDERRAMA BONILLA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich y la coasesoría del Dr. Hector Mayani Viveros. Este trabajo fue apoyado económicamente por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través proyecto IN 119398, y parcialmente apoyado por la Secretaría de Relaciones Exteriores (SRE) y el Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

A ti Señor, por cuidar y guiar cada uno de mis pasos

*A Alejo, Lucía, Martha, Liliana, Mabel, Piedad, a mis hermosos
sobrinos y a mis cuñados por todo el amor, el apoyo y la confianza
brindada siempre a través de la distancia*

*A ti Luis, por el amor compartido, por ser mi amigo, mi compañero y mi
colega. Por estar en cada uno de los momentos, buenos y malos. Mil*

Gracias

Agradecimientos

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por sus enseñanzas, sugerencias y apoyo brindado

Al Dr. Hector Mayani por sus formativas apreciaciones e indicaciones

A la Dra. Yvonne Rosenstein por sus valiosas aportaciones en los tutoriales

A todos los miembros del Jurado por sus formativos y valiosos comentarios en la revisión de éste trabajo : Dra Consuelo García, Dr. Fernando Esquivel y Dr. Froylán Gómez

A Alfonso Gómez por su apoyo, consejos y ayuda brindada

A Karin Levy por su siempre amable y solidaria colaboración

A Javier Dorantes por su amable colaboración

A los miembros de la biblioteca, Maribel, Shirley y Mary, por su eficiencia y voluntad de servicio

A la Secretaria de Relaciones Exteriores por el apoyo ofrecido

Al IBT y a la UNAM por haber podido disfrutar de la formación y las instalaciones que me brindaron

A Claudia, Juancho, Toño, Francisco, Laura, Josué, Adayisa por la amistad y cada una de las sonrisas compartidas

A los miembros de los grupos OTR y EGF por el apoyo y el tiempo compartido

A Nubia, Lilia, Alejo, Jorge, Herman, Hoovert por todo el cariño y la amistad brindada a través de la distancia, que hicieron más cálida su ausencia

INDICE GENERAL

INDICE FIGURAS	VI
INDICE DE TABLAS	VIII
GLOSARIO	IX
RESUMEN	XI
1 INTRODUCCION	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Hematopoyesis	3
2.2 Microambiente hematopoyético	5
2.3 Factores de crecimiento	7
2.4 Células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical humano	8
2.5 Cultivos de CH de SCUH	11
2.5.1 Cultivos a largo plazo	11
2.5.2 Bioreactores de perfusión	12
2.5.3 Cultivos suspendidos	13
2.6 Oxígeno disuelto	15
2.7 Velocidad de consumo de oxígeno	16
2.7.1 Mediciones en la fase gaseosa en estado estacionario	17
2.7.2 Mediciones en la fase líquida	19
2.7.2.1 Mediciones en fase líquida en estado estacionario:	19
2.7.2.2 Método estático:	20
2.7.2.3 Método dinámico:	22
2.8 Sustratos y Metabolitos	24
2.8.1 Sustratos: Glucosa y Glutamina	24
2.8.2 Metabolitos: Lactato y Glutamato	25

3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4	OBJETIVOS	31
4.1	General	31
4.2	Específicos	31
5	MATERIALES Y METODOS	32
5.1	Recolección de la sangre de cordón umbilical	32
5.2	Procesamiento para obtención de células mononucleares (MN)	32
5.3	Cultivos de colonias de progenitores hematopoyéticos (ensayos clonogénicos)	33
5.4	Cultivos estáticos	35
5.5	Obtención de células adherentes	36
5.6	Descripción de la cámara (respirómetro) diseñada para la determinación de la velocidad de consumo de oxígeno <i>ex situ</i>	36
5.7	Determinación del consumo de oxígeno por el electrodo	38
5.8	Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno de hibridomas	38
5.9	Métodos analíticos	39
5.9.1	Cuantificación de células mononucleares y células viables	39
5.9.2	Determinación de glucosa, glutamina, lactato y glutamato	39
5.10	Parámetros cinéticos	40
5.10.1	Determinación de la velocidad específica de crecimiento	40
5.10.2	Proliferación celular	40
5.10.3	Expansión celular	40
5.10.4	Velocidad específica del consumo o producción de sustratos o productos (q_i)	41
5.10.5	Consumo de glutamina	41
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1	Características de las muestras	43
6.2	Características de las células hematopoyéticas de SCUH	44
6.3	Determinación del consumo de oxígeno por el electrodo de oxígeno disuelto	45

6.4	Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno de la línea BCF-2 de hibridomas	46
6.4.1	Efectos posición del electrodo en el dispositivo	47
6.4.2	Efectos de la agitación durante las determinaciones <i>ex situ</i> de la VCO	47
6.5	Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno de las CH de SCUH	48
6.6	Relación creciente entre los progenitores totales y la VCO	49
6.7	Velocidades específicas de consumo de oxígeno de las diferentes poblaciones celulares	50
6.8	Cultivos estáticos	53
6.9	Células Adherentes	59
6.10	Caracterización metabólica (glucosa, glutamina, lactato y glutamato)	60
6.11	Relación creciente entre la concentración de glutamato y los progenitores totales	65
7	CONCLUSIONES	69
8	REFERENCIAS	72
9	APENDICE	81

INDICE FIGURAS

Figura 2-1. Esquema de la hematopoyesis	4
Figura 2-2. Esquema de un bioreactor con los términos empleados en el balance en fase gaseosa	18
Figura 2-3. Esquema del sistema para la determinación de la VCO basado en el método estático	21
Figura 2-4. Esquema del sistema para la determinación de la VCO basado en el método dinámico.	23
Figura 5-1. Gradiente obtenido con Ficoll-Paque Plus	33
Figura 5-2. Progenitores hematopoyéticos determinados a diferentes edades del cultivo	34
Figura 5-3. Respirómetro diseñado y empleado para las determinaciones ex situ de VCO	37
Figura 5-4. Esquema del respirómetro diseñado y empleado para las determinaciones ex situ de VCO.	37
Figura 6-1. Porcentaje de progenitores hematopoyéticos de muestras de SCU en el día de siembra de los cultivos	45
Figura 6-2. Comportamiento del OD con respecto al tiempo en medio sin células determinado en el respirómetro.	46
Figura 6-3. Variación de la VCO en función de la concentración de CFU progenitores totales.	51
Figura 6-4. Variación típica de la concentración de células MN y la VCO con respecto al tiempo.	52
Figura 6-5. Cinéticas de crecimiento de células MN determinadas en los diferentes recipientes.	56
Figura 6-6. Esquema de la cinética de la expansión máxima promedio	57
Figura 6-7. Relación de creciente entre la proliferación y expansión celular y el área de cultivo.	58
Figura 6-8. Cinética promedio de las células adherentes presentes en los cultivos en placas multipozo y cajas petri.	60
Figura 6-9. Cinéticas promedio del consumo de metabolitos en los diferentes recipientes.	61
Figura 6-10. Cinéticas promedio de la producción de metabolitos en los diferentes recipientes.	62

Figura 6-11. Relación creciente entre la diferencia de la concentración de glutamato en un tiempo i y la concentración inicial de glutamato con la concentración de progenitores totales	66
Figura 6-12. Cinética de una muestra que no presentó crecimiento de células MN ni de progenitores totales. PT: Progenitores totales	68
Figura 6-13. Cinética de una muestra que no presentó crecimiento de células MN, pero sí mostró crecimiento de progenitores totales	68

INDICE TABLAS

Tabla 2-1. Progenitores hematopoyéticos en sangre de cordón umbilical, de médula ósea y en sangre periférica por movilización con CSF-G	10
Tabla 2-2. Valores típicos de consumo específico de oxígeno de diferentes tipos celulares	16
Tabla 5-1. Volumen de medio de cultivo empleado en los distintos recipientes	35
Tabla 6-1. Concentración de células en las distintas fases de procedimiento	43
Tabla 6-2. Efecto de diferentes posiciones del electrodo en el dispositivo sobre la q_{O_2} de hibridomas	47
Tabla 6-3. Efecto sobre la viabilidad, la VCO y la q_{O_2} de CH de SCUH al agitar durante la determinación de la VCO <i>ex situ</i> .	48
Tabla 6-4. Comparación de distintos valores de q_{O_2} de CH de SCUH reportados por diferentes autores	49
Tabla 6-5. Valores máximos de diferentes parámetros obtenidos en los diversos recipientes para células MN y progenitores totales	57
Tabla 6-6. Velocidad específica de crecimiento determinada para células MN y para progenitores totales en los distintos recipientes	59
Tabla 6-7. Intervalos (mínimos y máximos) de las velocidades específicas de consumo/producción de los diferentes sustratos/metabolitos.	63

GLOSARIO

AMPA	Acido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolpropinoico (agonista del glutamato)
BCF-U	Unidad formadora de colonias eritroide primitivas
CD	Marcador de superficie de membrana (<i>cluster differentiation</i>)
CFC ⁺	Células formadoras de colonias progenitoras
CFC ⁻	Células no formadoras de colonias progenitoras
CFU	Unidades formadoras de colonias (<i>colony-forming unit</i>)
CH	Células hematopoyéticas
CSF	Factor estimulador de colonias (<i>colony stimulating factor</i>)
CT	Célula tallo
CTH	Células tallo hematopoyéticas
DC	Célula dendrítica
DIF	Factor inductor de diferenciación
E	Eritroide
EPO	Eritropoyetina
FBS	Suero fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
G	Granulocitos
GEMM	Granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Glc	Glucosa
GM	Granulocitos/macrófagos (<i>Granulocyte/Macrophage</i>)
GVHD	Enfermedad injerto vs huésped (<i>graft vs host disease</i>)
HeLa	Células de Henrietta Lach
HLA	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>human leucocyte antigens</i>)
HL-60	Leucemia promielocítica humana
IL	Interleucina
IMDM	Medio Iscove modificado por Dulbecco
IMSS	Instituto Mexicano de Seguro Social

k_{La}	Coefficiente de transferencia volumétrica de oxígeno
LIF	Factor inhibidor de leucemia (<i>Leukemia inhibitory factor</i>)
LTC	Cultivos a largo plazo (<i>Long-term culture</i>)
LTC-IC	Células iniciadoras de cultivos a largo plazo (<i>Long-term culture initiating cells</i>)
M	Macrófagos
MH	Microambiente hematopoyético
MIP-1•	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
MN	Células mononucleares
MO	Médula ósea
n	Número de muestras
NMDA	N-metil-D-aspartato (agonista del glutamato)
OD	Oxígeno disuelto
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PT	Progenitores totales
q	Consumo o producción específica de un sustrato o metabolito
q_{O_2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno
SCGF	Factor de crecimiento de células tallo humanas
SCF	Factor de células tallo (<i>Stem cell factor</i>)
SCUH	Sangre de cordón umbilical humano
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Sangre periférica
TAC	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TGF- β	Factor transformador del crecimiento beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno

LETRAS GRIEGAS

μ	Velocidad específica de crecimiento
ρ	Densidad
ν	Viscosidad cinemática (μ/ρ)

RESUMEN

Desde 1988 las células hematopoyéticas (CH) de sangre de cordón umbilical humano (SCUH) se han planteado como una fuente potencial para el restablecimiento del sistema hematopoyético de pacientes sometidos a radio y quimioterapia o con diversas enfermedades hematológicas. Estas células poseen ventajas conspicuas sobre las CH de médula ósea (MO) como son, mayor disponibilidad, mayor porcentaje de células formadoras de colonias de progenitores (CFC⁺), menor incidencia de la enfermedad injerto *vs* huésped y de infecciones vírales post-transplante, entre otras. Sin embargo, su gran desventaja es la baja concentración de éstas por kilogramo de peso de paciente para realizar trasplantes en individuos adultos. No obstante, la expansión *in vitro* ha sido la alternativa para alcanzar las concentraciones óptimas para efectuar el procedimiento médico mencionado. Aunque se han alcanzado concentraciones importantes de CH *in vitro*, no existe en la literatura información profusa del comportamiento metabólico y del comportamiento de las diferentes poblaciones celulares en estos cultivos.

En el presente estudio se realizó la caracterización de las poblaciones de progenitores hematopoyéticos, cuantificación de las células mononucleares (MN) y adherentes, además, la determinación de sustratos y metabolitos en cultivos estáticos de CH de SCUH. Con la realización de ensayos clonogénicos a la sangre recolectada (en el día cero de cultivo), se determinaron concentraciones de progenitores hematopoyéticos muy similares a estudios parecidos. Lo anterior permitió plantear a estos valores como los típicos en la sangre de cordón umbilical de neonatos mexicanos, de madres que asisten al centro de salud empleado en éste estudio. Adicionalmente, se observó sustentación de la hematopoyesis, aunque no se realizaron recambios de medio en los cultivos realizados.

Para un mejor conocimiento de los requerimientos metabólicos, se diseñó un respirómetro y se estableció la metodología apropiada para realizar las determinaciones de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) *ex situ*. El respirómetro, permitió determinar que la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) de CH de SCUH no adheridas variaba en el intervalo de 3.17×10^{-11} a

1.13×10^{-10} mmoles/cél/h. Además, las VCO determinadas permitieron establecer la existencia entre la VCO determinada *ex situ* y la concentración de progenitores totales una relación creciente entre ambos. Aunado a lo anterior, modelos poblaciones utilizando las VCO obtenidas *ex situ* y las poblaciones de progenitores hematopoyéticos determinadas por ensayos clonogénicos, permitieron determinar que los tipos celulares menos diferenciados poseen una q_{O_2} mayor que los tipos celulares más diferenciados. Esta relación creciente entre estos dos parámetros, posee amplias potencialidades para estimar de manera rápida (1.5 a 2.0 horas) la mayor concentración de progenitores hematopoyéticos, contrariamente a técnica convencional que requiere 14 días para obtener tal información.

Paralelamente se encontró en los cultivos estáticos tipo lote, realizados en diferentes recipientes, una relación decreciente entre el cociente área/volumen y la proliferación y expansión celular máximas. Además, aunque se observaron diferencias en los tiempos de máxima proliferación, las máximas expansiones se alcanzaron entre el tercer y octavo día de cultivo.

La determinación de los sustratos y metabolitos consumidos y producidos respectivamente, permitieron detectar la producción de glutamato en los primeros días del cultivo y su posterior desaparición. Con los resultados obtenidos, se estableció una relación creciente entre la diferencia de las concentraciones de glutamato a un tiempo determinado y la concentración de glutamato inicial, con la concentración de progenitores totales. Esta relación encontrada permite plantear a la determinación del glutamato en estos cultivos como una herramienta potencial para inferir de manera rápida y confiable la concentración de progenitores totales, de manera similar como se ha planteado y corroborado para la determinación de la VCO.

I INTRODUCCION

Las células sanguíneas maduras como, linfocitos, eritrocitos, neutrófilos, macrófagos, plaquetas, etc, que circulan por el cuerpo humano son formadas a través de la hematopoyesis. La hematopoyesis es un complejo proceso en el cual, una célula tallo totipotencial a través de la diferenciación, proliferación y expansión celular genera las células sanguíneas, en las concentraciones óptimas para su buen funcionamiento. La célula tallo durante el proceso de diferenciación celular genera diversas formas celulares a medida que las células se comprometen en uno de los linajes hematopoyéticos existentes. En este proceso de diferenciación se generan los progenitores hematopoyéticos como, CFU-GEMM, BFU-E, CFU-GM, CFU-G, CFU-M y CFC-Mk, los cuales se diferencian y generan las células maduras mencionadas.

El tejido u órgano en el que se realiza la hematopoyesis en el ser humano cambia a través de su desarrollo. Inicialmente, se lleva a cabo en el saco vitelino e hígado fetal. En etapas fetales posteriores y en la fase adulta, la hematopoyesis se efectúa en la médula ósea de huesos como, fémur, húmero, costillas, vértebras, entre otros. El proceso hematopoyético en la médula ósea se desarrolla gracias a la interacción de las CH con las células que conforman el microambiente hematopoyético como son, las células estromales, accesorias y los productos de las células mencionadas. Estas células producen citocinas, las cuales regulan la hematopoyesis. Específicamente, en cultivos *in vitro* las citocinas pueden ser suplementadas al medio de cultivo, en forma de citocinas recombinantes o pueden también ser obtenidas a partir de las células estromales que se adhieren a los recipientes de cultivo y producen las moléculas mencionadas.

La hematopoyesis es un activo proceso con altas tasas proliferativas que mantiene las concentraciones celulares constantes. No obstante, en pacientes con enfermedades hematológicas o en individuos con cáncer que han recibido quimioterapia y radioterapia, ocasionándoles inmunosupresión, se detectan variaciones en la concentración normal de las diferentes poblaciones celulares mencionadas. Para mejorar y normalizar estas concentraciones, el procedimiento clínico generalmente realizado, es el trasplante de médula ósea de un donante inmunológicamente compatible con el paciente. Sin embargo la ejecución de éste protocolo médico es afectado por la dificultad de conseguir donantes compatibles. Este inconveniente, indujo la búsqueda de otras alternativas tisulares como fuente de CH. Fue así, como desde 1988

se planteó a la SCUH como una fuente rica de CH humanas. Desde ésta fecha, se han realizado exitosos trasplantes de CH de SCUH en niños con diferentes padecimientos hematológicos. Sin embargo, la recuperación de pacientes adultos que han recibido trasplantes de SCUH, no ha sido tan exitosa como en infantes. El inconveniente anterior, es debido a que el número de progenitores hematopoyéticos presentes en el volumen de SCUH recolectado de un cordón, es insuficiente para los requerimientos celulares en pacientes adultos, y que promuevan la recuperación del sistema hematopoyético en éstos. De ahí, que el cultivo *in vitro* de estas células para incrementar las concentraciones de progenitores hematopoyéticos a los niveles óptimos para el trasplante en pacientes adultos, se ha planteado como la alternativa para los trasplantes en estos pacientes.

A pesar de que se han obtenido expansiones de células hematopoyéticas importantes *in vitro*, aún no se han alcanzado las concentraciones necesarias para trasplante en adultos. Para diseñar eficientes y económicas estrategias de cultivo y cosecha de las células cultivadas *in vitro*, es necesario un mejor conocimiento del comportamiento *in vitro* de estas células que permita entender el intrincado proceso celular que involucra diversas poblaciones celulares, en diferentes estados fisiológicos y de diferenciación, implicando variados requerimientos y comportamientos metabólicos. Aunque se ha realizado investigaciones del comportamiento *in vitro* de las CH de SCUH, la información del metabolismo de éstas células es actualmente escasa. Para obtener mayor información es necesario ahondar en esta área, para alcanzar números celulares importantes e inferir la edad de cultivo con la mayor población de progenitores hematopoyéticos, para realizar la cosecha de éstas.

En este proyecto se determinó el comportamiento cinético de diversas poblaciones celulares hematopoyéticas y del consumo de sustratos como, la glucosa y la glutamina, y la producción de metabolitos como el lactato y el glutamato en cultivos *in vitro* de las CH de SCUH. Las determinaciones se realizaron en cultivos lote a condiciones estáticas, con lo que se tuvo un modelo experimental sencillo con buena reproducibilidad. Adicionalmente para la determinación de la VCO, un importante parámetro indicador de estados fisiológicos en los cultivos, se diseñó un respirómetro y se estableció la metodología para realizar dicha medición *ex situ*.

2 ANTECEDENTES

2.1 Hematopoyesis

Las células maduras que circulan en la sangre como, eritrocitos, leucocitos y plaquetas, son generadas a partir de células tallo hematopoyéticas (CTH), mediante el proceso denominado hematopoyesis (Figura 2-1). Las CTH son células con capacidad de auto-renovarse, proliferar, expandir y diferenciarse, en los progenitores hematopoyéticos de todos los linajes: eritrocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), mastocitos, monocitos y macrófagos, plaquetas, linfocitos T y células asesinas naturales (*natural killer* –NK-).

La proliferación se refiere al número de veces que una célula puede dividirse y generar nuevas células hijas diferenciadas, mientras que la expansión es el número de veces que una célula progenitora puede producir más células progenitoras. En cambio, la auto-renovación es el potencial para producir células tallo hijas con idénticas características sin ninguna característica adicional, producto del proceso de diferenciación. Tanto la proliferación como la expansión dependen de factores intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos están relacionados al compromiso de la célula a un linaje determinado o a su estado de maduración y los extrínsecos, a la interacción de los diferentes tipos celulares y las citocinas encontradas en el microambiente hematopoyético. Estas potencialidades *in vitro* dependen del tipo de medio de cultivo, del horario de cambio de medio, de la temperatura, de la presencia o ausencia de suero, del número de células sembradas, etc. Sin embargo a medida que las células avanzan en el proceso de diferenciación se convierten en células progenitoras maduras y pierden su capacidad proliferativa y de auto-renovación (Mayani *et al.*, 1992).

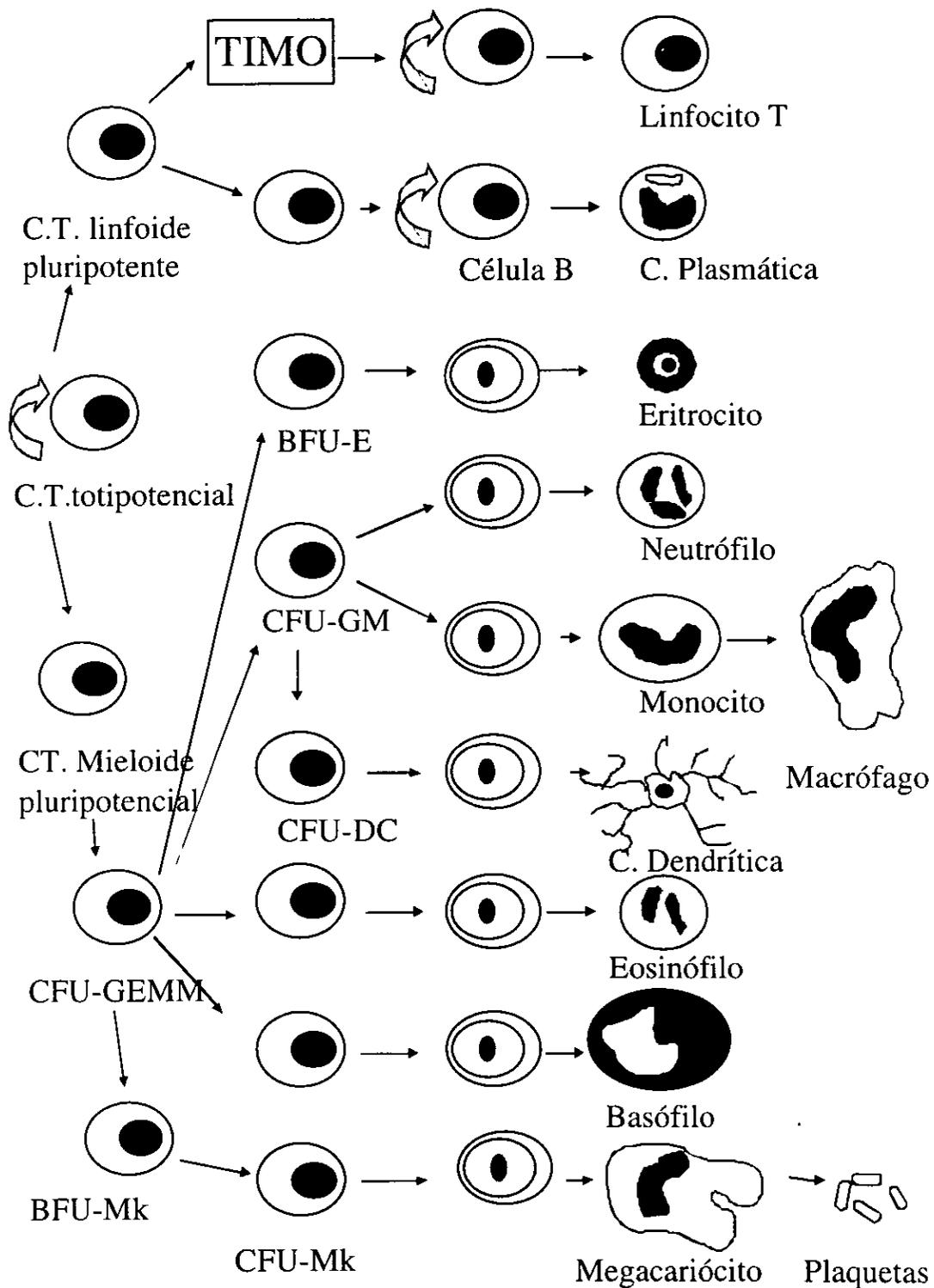


Figura 2-1. Esquema de la hematopoyesis. Modificado de McAdams *et al.* (1996). CT: célula tallo

En un individuo adulto normal diariamente se producen aproximadamente 2.5×10^9 eritrocitos, 2.5×10^9 plaquetas y 1.0×10^9 granulocitos por kilogramo de peso. La velocidad de producción varía de acuerdo con las necesidades del individuo. Más del 95% de la hematopoyesis (eritropoyesis, mielopoyesis y linfopoyesis) en los mamíferos adultos se realiza en la médula ósea (MO).

No obstante, el sitio de producción de las células sanguíneas cambia a través del desarrollo del individuo. Al inicio del desarrollo del individuo el saco vitelino y luego el hígado fetal, son los sitios de la eritropoyesis. Sin embargo, a partir del quinto mes de gestación, las cavidades óseas se convierten en los sitios exclusivos de proliferación granulocítica y megacariocítica, mientras que la eritropoyesis se realiza en el hígado fetal. Al momento del nacimiento las cavidades óseas son los únicos sitios de significativa actividad hematopoyética y son saturadas con CH. A partir de los 18 años del individuo, la médula hematopoyética se encuentra solamente las vértebras, costillas, cráneo, pelvis y epífisis proximales del fémur y del húmero. El volumen de las cavidades óseas se incrementa de 1.4% del peso del cuerpo en el nacimiento a 4.8% en el adulto, mientras que el volumen de sangre disminuye del 8% del peso al nacimiento a, 7% del peso corporal en el adulto.

Específicamente en los mamíferos la hematopoyesis se realiza en los espacios extravasculares, entre los senos de la MO. Las diferentes células de los diversos linajes se distribuyen en lugares diferentes en estos espacios, a los que se les denomina nichos, donde se favorece el desarrollo de acuerdo con el linaje al que se ha comprometido (Abboud & Lichtman, 1995). Se ha determinado que las CH con capacidad proliferativa se encuentran en un estado de dormancia (Ogawa, 1993), poseen una capacidad para soportar ambientes hipóxicos en los espacios senosoidales de la MO (Cipolleshi *et al.*, 1993) y son inhibidas a proliferar por reguladores negativos como, el factor transformador del crecimiento beta (TGF- β o la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α).

2.2 Microambiente hematopoyético

Se ha reportado la existencia de una distribución espacial de las células tallo y de los progenitores comprometidos al linaje mieloide o eritroide en la MO de ratón (Lord *et al.*, 1975)

estableciéndose una estructura definida en donde, según Schofield (1978), existen nichos de células tallo donde se establecen las condiciones de diferenciación de los diferentes linajes celulares. Este ambiente de diferencias microgeográficas se ha denominado microambiente hematopoyético (MH) y está compuesto de células estromales (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos), células accesorias (linfocitos T y monocitos) y sus productos (matriz extracelular y citocinas), que permiten la auto-renovación, proliferación y diferenciación de las CTH (Mayani *et al.*, 1992).

Antes de que Ye *et al.* (1994) reportaran la formación de capa de células estromales en cultivos *in vitro* de CH de SCUH, se consideraba que estas células no podían producirla en cultivo. Posteriormente, la formación de una capa estromal en estos cultivos ha sido confirmada por otros autores (Breems, *et al.*, 1998, López, 1999, Gutiérrez *et al.*, 2001). Sin embargo, se han determinado diferencias entre la capa de células estromales formadas en cultivos *in vitro* de CH de MO y de SCUH. En los primeros, el número de células adherentes es 3.5 a 4.1 más alto que en el cultivo de las segundas. Adicionalmente, las células adherentes de cultivos de MO forman capas confluentes de estroma; en cambio la capa adherente formada de células de SCUH, son células individuales distribuidas a través del pozo. De igual manera se ha determinado que las capas confluentes de estroma de MO producen factor de células tallo (SCF) en un intervalo de 436 a 579 pg/ml, interleucina 6 (IL-6) en un intervalo de 27 a 46 pg/ml y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) menos de 11 pg/ml. En cambio, en los cultivos de CH de SCUH se produce la IL-6 en un intervalo de 64 a 93 pg/ml, el TNF- α en un intervalo de 7 a 60 pg/ml y el SCF en niveles tan bajos, que no puede ser determinado por los sistemas de detección normalmente empleados.

Gutiérrez, *et al.* (2001) determinaron que del 60% al 75% de las células adherentes de la capa estromal formada en cultivos de MO eran del linaje de fibroblastos y el resto eran macrófagos. Mientras que el 90% de las células adherentes generadas en cultivos de CH de SCUH, eran macrófagos. De igual manera, reportaron la presencia de antígenos típicos de células dendríticas, como el marcador de superficie de membrana 1 (CD1), en la capa estromal de cultivos de células de SCUH. Esta determinación les permitió sugerir el crecimiento de células dendríticas en la capa estromal de estos cultivos.

Las células estromales son necesarias para la conservación y diferenciación de la progenie madura mieloide por las moléculas que generan, sin embargo, se ha demostrado que el contacto directo entre las células disminuye la capacidad de repoblamiento por los progenitores menos diferenciados (LTC-IC) en cultivos a largo plazo (Verfaillie, 1992). No obstante, Verfaillie & Cantazaro (1996) lograron mantener el 50% de las LTC-IC y la generación de progenitores comprometidos en 8 semanas, al colocar en membranas con poros de 0.45 μm entre la capa estromal y las CH de MO a cultivar para evitar el contacto directo entre los tipos celulares mencionados. Esto permitió determinar que el contacto directo entre progenitores hematopoyéticos y las células estromales es requerido para regular la proliferación y diferenciación de progenitores LTC-IC mientras que, la inhibición detectada está relacionada con la producción de citocinas inhibitorias y de señales inhibitorias de crecimiento generadas por la matriz extracelular. Los factores inhibitorios como TGF- β y MIP-1 α , son producidos por las capas estromales y se unen ávidamente a los proteoglicanos de la matriz extracelular (Tanaka *et al.*, 1983).

2.3 Factores de crecimiento

Como se ha mencionado anteriormente, las CH normales son afectadas por varias moléculas (citocinas) con actividad sobre la hematopoyesis como son, los factores estimuladores de colonias (CSF), las interleucinas y otros factores de crecimiento proteico. En general, estas moléculas trabajan en red y generan variados efectos sobre diferentes sistemas celulares. Los factores de crecimiento favorecen la viabilidad, la multiplicación celular (Sachs, 1987) y aumentan la actividad funcional de células maduras (Metcalf, 1985). Algunas citocinas poseen similitudes estructurales, similitudes en sus receptores de superficie y actividades superpuestas para el mantenimiento de la viabilidad, del crecimiento y de la diferenciación de las CH (Kishimoto *et al.*, 1992).

Hay cuatro grandes actividades estimuladoras de colonias del linaje mieloide (Sachs, 1986, Sachs, 1987) como son el CSF de macrófagos (M-CSF), que induce el desarrollo de colonias con macrófagos; el CSF de granulocitos (G-CSF), que induce el crecimiento de colonias con granulocitos; el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que induce el crecimiento de colonias con granulocitos, macrófagos, o ambos; y la IL-3, que promueve el crecimiento de

colonias con macrófagos, granulocitos, eosinófilos, mastocitos, eritrocitos y megacariocitos.

Existen otros factores como la IL-6, que actúan sobre la diferenciación del linaje mieloide sin tener actividad expansiva (Shabo *et al.*, 1989, citado por Sachs & Lotem, 1994). De igual manera se encuentran el factor inhibidor de leucemia (LIF) y la IL-11 (Sachs, 1994). Además, existen los factores que pueden inhibir la formación de colonias hematopoyéticas normales y la diferenciación de células leucémicas inducidas por IL-6 como son, el TGF- β 1 y el TNF- α . Tanto TGF- β 1 y TNF- α pueden inducir muerte celular programada (apoptosis) en células leucémicas mieloides y este efecto puede ser suprimido por IL-6, G-CSF, GM-CSF o IL-3 (Lotem & Sachs, 1992).

La interacción entre las diferentes proteínas inductoras e inhibitoras no solo permite la amplificación de señales sino que también facilita la actividad indirecta de las citocinas por la inducción a la producción de otras citocinas. Esto ocurre por ejemplo con la IL-1 que estimula indirectamente el crecimiento de células de mieloma al inducir a la IL-6 (Kawano *et al.*, 1989). Otra característica de las interacciones entre factores de crecimiento es la inducción de citocinas que dan señales al sistema para asegurar que las señales positivas no sean amplificadas más allá de cierto límite. Esta función es lograda por la producción de TNF- α y TGF- β 1 por GM-CSF o IL-6. Una función similar es realizada por la IL-10 la cual, es producida por los macrófagos activados y suprime la producción de citocinas inflamatorias como, IL-1, IL-6 y TNF- α (Fiorentino *et al.*, 1991). El efecto estimulante o inhibitorio generado por las interleucinas no solo está asociado con la inducción de otras citocinas sino también con la expresión de receptores de citocinas, como es el caso del TGF- β 1 que inhibe la expresión de citocinas y disminuye la expresión de receptores para citocinas, asegurando la inhibición de la hematopoyesis a nivel de citocinas y de receptores (Jacobsen, *et al.*, 1991).

2.4 Células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical humano

El trasplante de MO de donantes con complejo principal de histocompatibilidad (HLA) idéntico al HLA del receptor, ha sido exitosamente empleado en el tratamiento de pacientes con enfermedades hematológicas recurrentes o de alto riesgo, con síndromes de falla de médula, con inmunodeficiencia hereditaria y con desórdenes metabólicos. Sin embargo, el trasplante

alógeno de MO se ha limitado por la carencia de donantes compatibles en HLA y por las complicaciones post-transplante, cuando el donante y el receptor no son inmunológicamente idénticos (Wagner & Kurtzberg, 1998).

En la búsqueda de fuentes alternativas de CH se planteó a la SCUH como fuente rica de CTH y de progenitores hematopoyéticos. Esta suposición fue demostrada con la realización del primer transplante de éstas células a un paciente con anemia de Fanconi y con HLA idéntico a éste (Gluckman *et al.*, 1989). Posteriormente, se han realizado transplantes de SCUH para desordenes como, leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide aguda, neuroblastoma, anemia aplásica severa, anemia refractaria, talasemia, síndrome de Hunter, entre otras.

El número de transplantes de SCUH se ha ido incrementando alrededor del mundo. Eurocord (un grupo cooperativo europeo de pruebas clínicas) ha analizado 527 transplantes de SCUH de 121 centros de transplantes y de 29 países. De los cuales, 138 casos eran con donantes relacionados y 399 casos, eran con donantes no relacionados. Los resultados mostraron que la sobrevivencia de transplantes de SCUH fue comparable a la de los transplantes de MO con donantes relacionados y no relacionados (Gluckman, 2000). De igual manera, Netcord (un grupo cooperativo internacional de bancos de SCUH) ha reportado la realización de 1500 transplantes de SCUH para niños con enfermedades hematológicas malignas o no malignas que han mostrado sobrevivencia después del transplante de SCUH, similar o superior de la presentada después de transplante de MO de donantes compatibles. De 68 transplantes de SCUH realizados en adultos, 18 pacientes sobrevivieron y a los 22 meses (mediana) después del procedimiento los pacientes no presentaban la enfermedad. Es importante destacar, que muchas de las muertes presentadas en pacientes adultos se debió posiblemente a la aplicación de un número menor de células MN a la dosis óptima (2.2×10^7 células MN) de células MN por kilogramo de peso del paciente (Gluckman, 2001).

Se ha determinado, en muchos laboratorios, que la SCUH contiene una mayor proporción de unidades formadoras de colonias (CFU) como, CFU-GEMM, BFU-E, CFU-GM, CFU-MK, que la sangre de MO y sangre periférica (SP) de adultos (Hows *et al.*, 1992; Mayani *et al.*, 1998). Sin

embargo, se encuentra variación entre los laboratorios en la cuantificación de progenitores hematopoyéticos (Tabla 2-1).

Tabla 2-1. Progenitores hematopoyéticos en sangre de cordón umbilical, de médula ósea y de sangre periférica por movilización con G-CSF. Resultados del Hospital Saint-Louis y EUROCORD. Números representan la mediana con el intervalo entre paréntesis. (Gluckman, 1998)

<i>Células</i>	<i>SCUH</i> (<i>n=59</i>)	<i>SP</i> (<i>n=11</i>)	<i>MO</i> (<i>n=111</i>)
MN ($10^8/\text{kg}$)	0.5 (0.1 a 9.8)	8.12 (3.3 a 49.8)	2.3 (0.5 a 7.0)
CFU-GM ($10^9/\text{kg}$)	2.0 (1.0 a 21.0)	47.5 (14.0 a 390.0)	6.3 (1.0 a 24.5)

Además, se ha reportado que las CH de SCUH presentan un mayor potencial de proliferación/expansión que las CH de MO, porque poseen una mayor habilidad para salir de G_0/G_1 (Biesecker *et al.*, 1993; Laver *et al.*, 1990) y por su habilidad para generar células con marcador de membrana típico de células no diferenciadas ($CD34^+$) (Lansdorp *et al.*, 1993).

Otra característica importante de las CH de SCUH y sobre todo la que las hace potenciales células para ser trasplantadas, es la reducida incidencia y severidad de la enfermedad injerto *versus* huésped (GVHD) que han mostrado post-transplante. La GVHD es una compleja reacción inmune mediada por las células T reactivas presentes en el donante (Ferrara & Deeg, 1991), las cuales, reaccionan ante los diferentes HLA de las células del huésped conllevando a una serie de eventos como son, el aumento de moléculas coestimuladoras y de adhesión, la producción de IL-2 y de su receptor, la generación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6. Durante la fase efectora, las células T activadas proliferan y liberan varias citocinas que producen daño tisular, por la acción de células T citotóxicas activadas, de NK y de macrófagos. Se han reportado que las células T, las NK y los macrófagos de SCUH poseen propiedades inmunológicas diferentes a las de la SP y de MO, que les permite presentar mayor tolerancia inmunológica a los aloantígenos. Esta mayor tolerancia inmunológica puede ser debida a la presencia de células reguladoras/supresoras, las cuales pueden suprimir la función de las células T que reconocen aloantígenos. Se ha planteado que la supresión clonal es el mecanismo de tolerancia a los aloantígenos, en la cual, las células T reguladoras/supresoras inhiben la función de las células T reactivas (Charlton *et al.*, 1994). Adicionalmente, casi todos los linfocitos T $CD3^+$ de las CH de

SCUH expresan la isoforma CD45RA que es característica de las células T que aún no han sido activadas por antígenos exógenos (células T *naive*) (Harris *et al.*, 1992; Roncarolo *et al.*, 1998).

Otra característica y ventaja importante de las CH de SCUH es la disponibilidad de esta sangre en comparación con la de MO y que su recolección no genera ni traumatismos ni inconvenientes en el donante, como ocurre con la obtención de la sangre de MO y la movilización de CTH por CSF a SP (Thompson, 1995). Similarmente, existen reportes sobre la menor incidencia de infecciones virales post-transplante con CH de SCUH, en comparación con los trasplantes de sangre de MO.

Otra característica relevante es de ser una potencial fuente de células viables para terapia génica autóloga, en tratamientos de infecciones, cáncer o enfermedades genéticas, por su alta capacidad proliferativa reportada (Lansdorp *et al.*, 1993; Broxmeyer, 1998).

Como se mencionó anteriormente, a pesar de las ventajosas características de las CH de SCUH frente a las de la MO, los trasplantes de estas células en pacientes adultos se han visto limitados por las bajas concentraciones obtenidas de un cordón umbilical, que son insuficientes para restablecer el proceso hematopoyético en éstos pacientes. Ante estas necesidades se han diseñado y empleado diferentes tipos de recipientes de cultivo y reactores para la expansión de estas células *in vitro*.

2.5 Cultivos de CH de SCUH

2.5.1 Cultivos a largo plazo

Igual que para CH murinas de MO (Dexter, 1977), se ha empleado la técnica de cultivo a largo plazo (LTC) para las CH de MO humana (Gartner & Kaplan, 1980). Los LTC permiten la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de las células precursoras en diferentes linajes en la ausencia de factores de crecimiento suplementados, pero en la presencia de células estromales, que sustentan la hematopoyesis por la producción de dichos factores (Eaves *et al.*, 1991). El protocolo de estos cultivos plantea el reemplazo regular y manual del medio (del 10% al 50% del volumen total) de cultivo por medio fresco (de todos los días a cada 7 días de cultivo, dependiendo de los objetivos de la investigación), permitiendo mantener cultivos de CH de MO humana durante 3 meses.

Aunque los LTC de células humanas permitieron establecer la posibilidad de expandir las CH humanas *in vitro* se observó que en estos cultivos, el número de células totales y de progenitores hematopoyéticos disminuían exponencialmente durante el cultivo. Esta disminución celular podría estar relacionada con la alteración de la microestructura celular por la manipulación durante los reemplazos del medio de cultivo (Varma, 1992), por la susceptibilidad del cultivo a las variaciones causadas por las diferencias en las técnicas de trabajo entre los manipuladores, por los riesgos de contaminación por la intensa manipulación, por la incapacidad de estas células para soportar altas densidades celulares cuando toda el área de cultivo se satura y por la acumulación de metabolitos y moléculas que inhiben la expansión de los progenitores hematopoyéticos. Para contrarrestar estas limitantes, se planteó el uso de sistemas de perfusión continua donde, el diseño de la cámara, la forma de retener las células, la velocidad de perfusión y la posibilidad de formar o no estroma, son las mayores diferencias entre los diversos diseños empleados. Adicionalmente, se utilizaron los factores de crecimiento y su habilidad para actuar sinérgicamente, permitiendo la expansión de progenitores en la ausencia de una capa estromal preformada. Este hallazgo, estableció muchas posibilidades de expansión y la búsqueda por la combinación apropiada de citocinas para obtener el tipo de progenitores hematopoyéticos deseados (Brandt *et al.*, 1992).

2.5.2 Bioreactores de perfusión

Palsson *et al.* (1993), en un sistema de éste tipo y cultivando CH de MO humana lograron obtener a las dos semanas de cultivo una proliferación de 20 a 25 veces de células MN y una expansión de CFU-GM de 10 a 30 veces. Paralelamente, Koller *et al.* (1993) cultivando CH de MO y empleando un diseño similar que los autores anteriores, observaron un incremento continuo de células totales con una proliferación máxima de 8 a 11 veces en el día 14 de cultivo; mientras que las BFU-E se expandieron 12 veces en el día 8 de cultivo. Para superar las limitaciones de crecimiento por saturación del área de cultivo, Oh *et al.* (1994) realizaron retiro (cosecha) periódico de las células del cultivo, lo que les permitió calcular una proliferación total de 100 veces y una expansión de CFU-GM de 30 veces en el día 27. Aunque la capa de células adherentes fue estable, la capa de células no adherentes disminuyó al incrementarse el número de pases.

Posteriormente, Sandstrom *et al.* (1996) cultivaron CH de MO y movilizadas a SP humana en

cultivos estáticos y de perfusión con estroma y sin estroma y con medio suplementado con citocinas recombinantes (IL-3, IL-6, G-CSF y SCF). Para los cultivos de perfusión modificaron la cámara de perfusión mejorando la retención celular y facilitando la inoculación y construcción, entre otras. En los cultivos de perfusión se alcanzaron expansiones máximas de CFU-GM de 17 y 19 veces en cultivos con y sin estroma, respectivamente; mientras que en los cultivos estáticos, se obtuvieron expansiones máximas de CFU-GM de 18 y 13 veces en cultivos con y sin estroma, respectivamente. De manera sorpresiva y contrastante, determinaron que las expansiones de CFU-GM eran mayores en cultivos de perfusión sin estroma, a pesar que se determinó que los cultivos en perfusión con estroma eran metabólicamente más activos que los que no poseían estroma. Años después, para disminuir la manipulación y los riesgos de contaminación que esto conllevaba, Koller *et al.* (1998a) diseñaron un sistema de perfusión automatizado para cultivar CH de SCUH con medio suplementado con citocinas recombinantes. Los autores lograron obtener una expansión de CFU-GM de 126 veces a los 12 días en promedio de cultivo. Aunque no se formó estroma en estos cultivos, se detectaron diferentes factores de crecimiento producidos endógenamente por células accesorias no estromales.

A pesar de las expansiones logradas con estos sistemas el reemplazo continuo del medio de cultivo y de sus suplementos aún no agotados conlleva a problemas. Por ejemplo, se diluyen factores de crecimiento importantes para las células, que se encuentran en bajas concentraciones, se puede producir daño mecánico y se convierten en sistemas demasiado costosos por el cambio continuo de medio y de sus suplementos. Adicionalmente, es difícil realizar muestreos que permitan determinar la distribución, la viabilidad y la concentración celular impidiendo un conocimiento preciso del microambiente desarrollado en el sistema. Como una alternativa de cultivo, también se han realizado investigaciones en cultivos suspendidos de CH.

2.5.3 Cultivos suspendidos

A diferencia de los cultivos de perfusión, los cultivos suspendidos brindan un ambiente homogéneo, facilitan la toma de muestras, permiten el establecimiento de estrategias de control y su escalamiento es relativamente sencillo. Adicionalmente la optimización de la expansión de CH en cultivos lote suspendidos, podría ser económicamente más favorable que la realizada en bioreactores de perfusión, ya que no sería necesaria la adición continua de medio y de factores de

crecimiento.

Sardonini & Wu (1993) al cultivar CH de MO en frascos agitados con medio suplementado con citocinas y con reemplazo regular de medio, obtuvieron en bioreactores suspendidos una proliferación de 1.6 comparado con el valor normalizado de 1.0 para cultivos controles estáticos, realizados con la misma combinación de citocinas y de horarios de reemplazo de medio.

Posteriormente, Zandstra *et al.* (1994) en cultivos suspendidos de CH de MO humana, sin formación de capa estromal y con reemplazo periódico, obtuvieron un incremento de células primitivas (LTC-IC) y de progenitores totales de 7 y 22 veces, respectivamente. Los resultados alcanzados les permitió sugerir la potencialidad del escalamiento ascendente de bioreactores suspendidos para la obtención de concentraciones requeridas de progenitores hematopoyéticos para los procedimientos clínicos. En otro estudio Zandstra *et al.* (1997), realizando cultivos suspendidos con diferentes combinaciones de citocinas, encontraron que la velocidad de consumo de las citocinas dependía del tipo de citocina y de la célula estimulada. El estudio sugiere que la disminución de la citocinas podría generar un mecanismo de control de retroalimentación *in vivo*, que contribuiría al control de la proliferación y la diferenciación de CH primitivas.

Años después, Collins *et al.* (1997) cultivando CH de SCUH y de SP en bioreactores agitados y con protocolos de reemplazo de medio suplementado con citocinas, determinaron la correlación directa entre la máxima concentración de CFC^+ y los valores máximos de q_{Glc} y de q_{Lac} , en un amplio rango de combinaciones de citocinas. Sin embargo, Collins *et al.* (1998a) cultivando CH de SCUH y de SP en bioreactores agitados y aplicando protocolos de alimentación y de dilución de células sugirieron que eran las células post-progenitores del linaje granulocítico monocítico las que obtenían una mayor proporción de su energía a partir de la glicólisis, en vez de ser las CFC^+ como habían planteado anteriormente. Adicionalmente, bajo las condiciones de cultivo realizadas lograron expandir las CFU-GM 15 veces con respecto a su concentración inicial.

De manera similar, De León (1999), obtuvo una proliferación de 14 y una expansión de CFU-GM de 10 veces, en cultivos de CH de SCUH en bioreactores agitados y sometidos a 20% de OD controlado.

2.6 Oxígeno disuelto

El oxígeno es un sustrato importante en el metabolismo de las células animales. Los requerimientos de oxígeno varían de acuerdo con el tipo de célula y de las condiciones del cultivo. Sin embargo, la solubilidad del oxígeno en el agua es muy baja (0.24 mmoles/l a 25 • C y 1.0 atm) (Ruffieux *et al.*, 1998) y disminuye de un 5% a un 25% por la adición de sales, vitaminas, etc. (Doran, 1999).

En las células animales, diferentes procesos fisiológicos son afectados por la oxigenación como son la adherencia y la propagación (Rotem *et al.*, 1994). El crecimiento es retardado en bajas concentraciones de oxígeno, sin embargo una alta concentración puede ser tóxica o inhibitoria. No obstante, existen diferentes reportes que han determinado que las CH son funcionales a bajas concentraciones de oxígeno. Según Cipolleschi *et al.*, (1993) la sangre arterial al entrar a la estructura canicular y sinuosa de la MO, llega con baja concentración de oxígeno disuelto (OD). De acuerdo con características estructurales se ha planteado que la concentración promedio de oxígeno en la sangre de la MO es significativamente más baja que en otros órganos y tejidos. Adicionalmente, se ha determinado que las presiones parciales del oxígeno en la sangre arterial y venosa son de 100 mmHg (12.5%) y de 40 mmHg (5%) respectivamente. Por lo tanto, la concentración de oxígeno en el aire (21%) es mas alta que en los tejidos (Ono & Alter, 1995).

En cultivos estáticos de CH de SCUH realizados a bajas concentraciones de oxígeno (5%) en la fase gaseosa, se ha obtenido un mayor incremento de la concentración de CFU-GM que en cultivos sometidos a 21% (Bradley *et al.*, 1978; Rich & Kubanek, 1982; Iahikawa & Ito, 1988). De manera similar Koller *et al.* (1992b) encontraron en cultivos con reemplazo de medio de CH de SCUH y de MO, una mayor expansión de CFU-GM en los cultivos sometidos a 5% de oxígeno en la fase gaseosa, que en cultivos sometidos a 20%. Sin embargo, existen discrepancias entre diferentes reportes de cultivos de CH de MO crecidas en bioreactores de perfusión, en donde algunos autores plantean un mayor crecimiento de células a bajas concentraciones de OD (5%) (Koller *et al.*, 1992a) mientras que, otros obtuvieron un mayor crecimiento celular a concentraciones de OD mayores (Palsson *et al.*, 1993). Esta diferencia podría estar muy relacionada con una limitación que presentan los sistemas de perfusión como los que emplearon los autores. La limitación a la que se hace referencia, es la imposibilidad de determinar la

verdadera concentración del OD presente en la cámara de perfusión donde se encuentran inmovilizadas las células, además que, fue ubicado a la salida del medio de alimentación muy retirado de la cámara mencionada.

Como se mencionó, por tener el oxígeno una fuerte influencia sobre los procesos fisiológicos es importante abastecer de forma óptima el oxígeno necesario para el crecimiento celular de cultivos *in vitro*. Una manera de conocer la cantidad de oxígeno necesaria, es determinando la VCO y la q_{O_2} . Estos parámetros además de brindar la información ya expuesta, son esenciales para el escalamiento ascendente del proceso y la determinación de la actividad fisiológica del cultivo.

2.7 Velocidad de consumo de oxígeno

Aunado a lo expuesto en la sección anterior, la VCO es un parámetro importante para el establecimiento de variables de control (Palomares & Ramírez, 1996; 1981; Butler & Jenkins, 1989). Diferentes autores han determinado la existencia de una relación directa entre la VCO y la densidad celular (Yamada *et al.*, 1990; Fleischaker & Sinskey, 1981). En diversos cultivos de células de mamífero, el empleo de la VCO ha permitido el establecimiento de estrategias de alimentación, mejorando la productividad de éstos (Singh, 1996; Higareda *et al.*, 1997; Palomares & Ramírez, 1996). Las células de mamífero consumen oxígeno entre 0.5×10^{-10} y 5×10^{-10} mmoles O_2 /cél/h. La Tabla (2-2) reúne los valores de q_{O_2} de diferentes células animales y diversos microorganismos.

Tabla 2-2. Valores típicos de consumo específico de oxígeno de diferentes tipos celulares

<i>Tipo de célula</i>	q_{O_2} , mmoles O_2 /cél/h	<i>Referencia</i>
Granulocitos	0.22×10^{-11}	Bird, 1951
HL-60 ^a	0.97×10^{-10}	Kimura <i>et al.</i> , 1987
Híbridomas HB-32	3.3 a 3.7×10^{-10}	Ramírez & Mutharasan, 1990
Especies de <i>Streptococci</i>	14.4 a 72.8×10^{-3} g/cél/h	Atkinson & Mavituna, 1983
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.85 mmoles O_2 /g peso seco/h	Rocha, 1999

^a:HL-60: Leucemia promielocítica humana

Varios grupos han determinado la VCO de diversas células empleando diferentes métodos para su determinación, sin embargo la información de la VCO de CH de SCUH es escasa. Peng & Palsson (1996), modificando un respirómetro diseñado por Rotem *et al.*(1994), determinaron la q_{O_2} de células MN de MO humana (adherentes y no adherentes) crecidas en placas de 6 pozos. Lograron determinar que al comienzo del cultivo la q_{O_2} fue baja y fue incrementándose a lo largo del cultivo desde 0.05×10^{-10} hasta 0.38×10^{-10} mmoles O_2 cel/h para células adherentes y desde 0.05×10^{-10} hasta 0.25×10^{-10} mmoles O_2 cel/h, para las células no adherentes. Adicionalmente, se ha determinado la existencia de una correlación entre la VCO y la concentración de progenitores hematopoyéticos en cultivos en bioreactores agitados e instrumentados de CH de SCUH a 50% de OD (Collins *et al.*, 1998a) y a 10% y 20% de OD (De León, 1999). La correlación encontrada permite definir el tiempo de máxima expansión y por ende, el tiempo óptimo de cosecha y extracción de los progenitores hematoyéticos sin tener que esperar 14 días de incubación para conocer la concentración de progenitores, tal y como lo requiere la técnica convencional (cultivo de progenitores en medio basado en metilcelulosa).

Existen diferentes métodos para determinar la VCO, los cuales se dividen en dos grupos: métodos basados en las determinaciones de O_2 en la fase gaseosa y los métodos basados en las determinaciones del O_2 en la fase líquida.

2.7.1 Mediciones en la fase gaseosa en estado estacionario

Estas determinaciones se basan en la medición confiable de las presiones parciales y de las velocidades de los flujos de gases empleando analizadores de gases o espectrómetros de masa. La figura (2-2) esquematiza un bioreactor con la fase líquida y la fase gaseosa.

Suponiendo que el sistema esta bien mezclado, la ecuación de balance en la fase gaseosa de la figura (2-2) es,

$$\frac{dC_G}{dt} V_G = F_e y_e - F_s y_s - k_L a (C^* - C_L) V_L \quad (2-1)$$

Donde, V_G , es el volumen del gas, V_L , es el volumen del líquido en el bioreactor, F_e , es el flujo gaseoso molar a la entrada, F_s , es el flujo gaseoso molar a la salida del bioreactor, $k_L a$, es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, y_e , es la fracción molar de oxígeno en la fase

gaseosa a la entrada, y_s , es la fracción molar de oxígeno en la fase gaseosa a la salida del bioreactor, C^* , es la concentración a la saturación de oxígeno disuelto, C_L , es la concentración del oxígeno disuelto y C_G , es la concentración de oxígeno en la fase gaseosa.

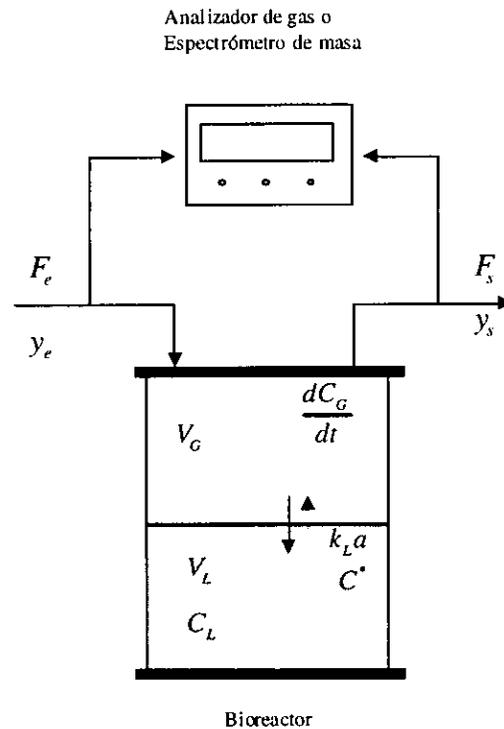


Figura 2-2. Esquema de un bioreactor con los términos empleados en el balance en fase gaseosa

Teniendo como suposición que la VCO es relativamente pequeña con respecto al flujo de gases, se puede asumir que existe un estado estacionario en la fase gaseosa ($dC_G/dt=0$), además, que las velocidades del flujo gaseoso a la entrada y a la salida son idénticas ($F_e=F_s$). Debido a que la transferencia volumétrica de oxígeno debe ser siempre igual o mayor que el consumo de oxígeno, la ecuación (2-1) resultante de las suposiciones establecidas se iguala a VCO. Quedando,

$$VCO = \frac{F_e}{V_L} (y_e - y_s) \quad (2-2)$$

Las variables F_e y y_e se pueden obtener de un controlador de flujo másico mientras que, la y_s debe ser determinada con un analizador de gases o un espectrómetro de masas.

Este es el método más empleado para determinar la VCO en fermentaciones microbianas, y puede realizarse continuamente y en tiempo real, de manera no intrusiva y sin generar efectos adversos sobre el cultivo. A pesar de que los analizadores de gases son confiables, simples y económicos, su sensibilidad es insuficiente para monitorear los cultivos animales que presentan velocidades metabólicas menores que cultivos de microorganismos (Tabla 2-2). De igual manera, los espectrómetros de masa son instrumentos caros y sofisticados con alta precisión sin embargo, ésta es insuficiente para detectar los muy pequeños cambios en la presión parcial de oxígeno durante los cultivos de células animales. Eyer *et al.* (1995) determinaron la VCO de cultivos de hibridomas en 2.4 litros, con un espectrómetro de masa. Sin embargo, obtuvieron una alta fluctuación de la VCO y errores cercanos al 50% de la VCO máxima esperada. Estos resultados, debido a que en las condiciones de operación de cultivos de células animales, flujos altos y volumen de cultivo pequeño, la diferencia de concentración de O₂ a la entrada y a la salida del bioreactor fue tan pequeña que la sensibilidad del equipo fue insuficiente para detectarla.

2.7.2 Mediciones en la fase líquida

Existen tres métodos: el de fase líquida en estado estacionario, el dinámico y el estático.

2.7.2.1 Mediciones en fase líquida en estado estacionario:

Es un método simple y la instrumentación es relativamente económica. El balance de oxígeno alrededor de la fase líquida del bioreactor, suponiendo un estado estacionario queda expresado así,

$$k_L a (C^* - C_L) = VCO = qO_2 x \quad (2-3)$$

Sin embargo, son requeridos los valores de $k_L a$ y C^* los cuales en general varían durante el cultivo y deben ser estimados frecuentemente. No obstante, Lavery & Nienow (1987) mostraron que los valores de $k_L a$ son similares en cultivos de células animales con diferentes composiciones de medio de cultivo, pero operados a las mismas condiciones de aireación y agitación. De ahí que se pueda considerar al $k_L a$ relativamente constante a lo largo de un cultivo de células animales, porque la composición fisicoquímica del medio cambia muy poco durante el tiempo. Asumiendo que existe un equilibrio de oxígeno entre las fases líquida y gaseosa, el C^* puede ser calculado de la presión parcial de oxígeno a la entrada empleando las ecuaciones (2-4) y (2-5), si se supone que para un flujo de gases alto comparado con el consumo de oxígeno, y una fase gaseosa bien

mezclada, las concentraciones de oxígeno a la entrada, a la salida y en la fase gaseosa del bioreactor son aproximadamente iguales.

$$P_{O_2} = P_T y_{O_2} \quad (2-4)$$

$$C_i^* = \frac{C_{H_2O} P_{O_2}}{H} \quad (2-5)$$

C_{H_2O} , es la concentración molar del agua, p_{O_2} , es la presión parcial de oxígeno, H , es la constante de Henry, P_T es la presión total y y_{O_2} es la fracción mol de O_2 .

Teniendo en cuenta que el k_{LA} no cambia durante el cultivo y las suposiciones anteriores, Higareda (1994) propuso la siguiente ecuación en forma discretizada para determinar la VCO en línea en cultivos de hibridomas.

$$VCO = \frac{k_L a}{2} [(C_i^* + C_{i+1}^*) - (C_{L_i} + C_{L_{i+1}})] - \frac{C_{L_{i+1}} - C_{L_i}}{t_{i+1} - t_i} \quad (2-6)$$

donde, t es tiempo e i , es el elemento de discretización del tiempo. Tal ecuación ha sido empleada exitosamente por Palomares & Ramírez (1996) y De León (1999a) para realizar determinaciones en línea en cultivo de células de insecto y de CH de SCUH, respectivamente.

2.7.2.2 Método estático:

El método estático puede ser aplicado a bioreactores operados en la modalidad continua o por perfusión y equipados con cualquier sistema de oxigenación (burbujeo, aireación superficial, tubo difusor). Se determina la VCO de la diferencia de las lecturas de dos electrodos de OD colocados en las corrientes de alimentación y cosecha del medio de cultivo teniendo en cuenta la velocidad de flujo del medio. Este método se basa en el hecho que cuando el medio de cultivo fluye a una velocidad constante, el OD disminuye a lo largo de la longitud recorrida. Es un método que permite obtener una señal de manera continua y puede ser utilizado tanto en cultivos animales como microbianos y en bioreactores mayores a 2 litros.

Yoon & Konstantinov (1994), sugirieron una modalidad para determinar la VCO por el método estático en cultivos lote (Figura 2-3). En este arreglo se emplea un dispositivo en forma de U externo al bioreactor. El medio fluye a través de una de las secciones del dispositivo a una velocidad de flujo F constante y el OD disminuye linealmente a lo largo de la longitud de éste.

Un segundo electrodo se coloca a una distancia L_1 del bioreactor en el dispositivo. El medio es bombeado continuamente al dispositivo externo y retorna al bioreactor a través de la segunda sección del dispositivo en forma de U, cuya longitud, L_2 es menor que L_1 , (Figura 2). La VCO puede ser calculada de acuerdo con la ecuación (2-7):

$$VCO = \frac{4F}{L_1\pi D^2} (OD_1 - OD_2) = \frac{1}{\Delta T} (OD_1 - OD_2) \quad (2-7)$$

donde, OD_1 y OD_2 , son las lecturas de los electrodos de OD, ΔT , es el tiempo en que viaja el fluido del bioreactor al electrodo OD_2 , y D , es el diámetro del tubo.

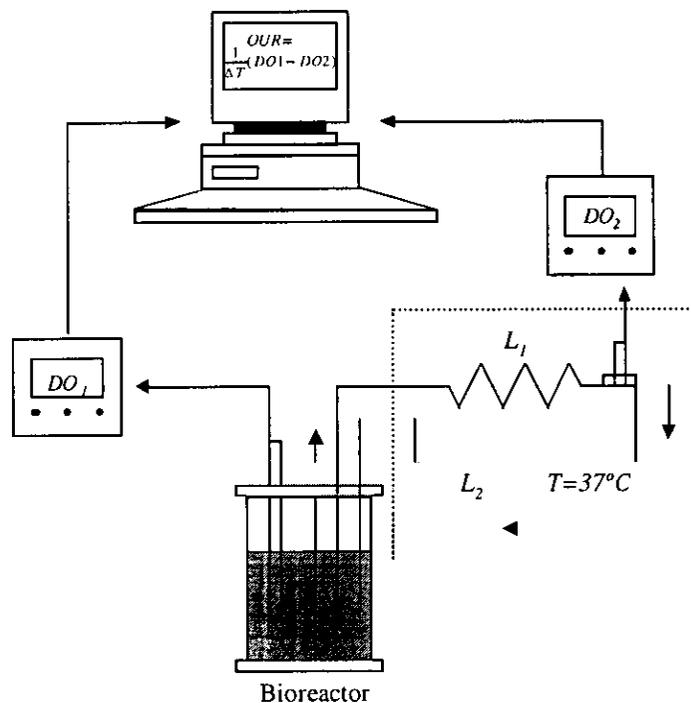


Figura 2-3. Esquema del sistema para la determinación de la VCO basado en el método estático

El método estático permite un monitoreo continuo de la VCO, a diferencia del método dinámico (Ver adelante) que genera información de la VCO de manera discontinua. Sin embargo, la implementación de éste tipo de mediciones en cultivos lote presenta los siguientes inconvenientes. Requiere de dos electrodos y de dos amplificadores de OD, de bomba, de controlador de temperatura y de la construcción del dispositivo mencionado dentro de un sistema

de calentamiento, lo que lo vuelve costoso e impráctico. Además, es necesario disminuir el tiempo de residencia, que se logra disminuyendo la longitud del tubo o aumentando la velocidad con que el fluido es bombeado al dispositivo, que puede afectar la viabilidad de células animales. De igual manera, el cálculo de la VCO requiere que la diferencia OD_1-OD_2 sea suficientemente grande, lo cual requiere una calibración continua de los electrodos.

2.7.2.3 Método dinámico:

Este método fue conceptualizado hace 35 años (Taguchi & Humphrey, 1966) y está basado en la eliminación de la transferencia de oxígeno al sistema de cultivo, ya sea por interrupción del suministro de oxígeno o la eliminación de la fase gaseosa. El balance de oxígeno en la fase líquida en estado no estacionario se expresa como,

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a(C^* - C_L) - VCO \quad (2-8)$$

Por la eliminación de la transferencia de oxígeno el término $k_L a(C^* - C_L)$ se iguala a cero. La disminución del OD en el tiempo es causada por la respiración de las células, por lo tanto, la VCO se puede determinar directamente de la pendiente de la curva entre el OD y el t . Debido a que la VCO depende directamente del q_{O_2} y de la concentración de células viables (Singh, 1996), por lo tanto la ecuación (2-8) queda como,

$$\frac{dC_L}{dt} = -VCO = -q_{O_2} X \quad (2-9)$$

Cuando se emplea éste método en cultivos en bioreactor el suministro de oxígeno es suspendido por un tiempo limitado ($k_L a(C^* - C_L) = 0$) y el OD debe ser mantenido en un valor mayor al nivel crítico, lo que asegura que la VCO sea constante. Después que la determinación ha sido realizada, el suministro de oxígeno se reanuda. Sin embargo, ésta metodología no brinda una medición continua y debe ser iniciada periódicamente a intervalos regulares. Además, en bioreactores la suspensión del suministro de oxígeno genera disturbios que pueden ser perjudiciales y dificulta los esquemas computacionales de control. No obstante, los problemas mencionados pueden ser eliminados al emplear un dispositivo externo que evite generar disturbios en el bioreactor. En éste caso, se necesitaría de un segundo electrodo y amplificador de OD (Figura 2-4). De manera similar, el empleo de un dispositivo para la medición *ex situ* de la VCO, elimina los inconvenientes discutidos anteriormente.

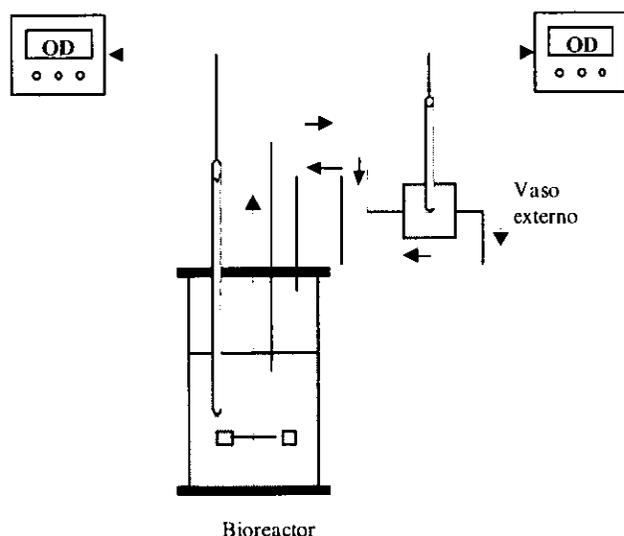


Figura 2-4. Esquema del sistema para la determinación de la VCO basado en el método dinámico. Implementado con un electrodo de OD o un segundo electrodo de OD insertado en un recipiente externo.

Numerosos estudios de determinación de la VCO se han realizado empleando el método dinámico en cultivos de baja demanda, como son los de células animales, por ser un método exacto, preciso, directo, confiable y versátil (van Dissel *et al.*, 1986; Kimura *et al.*, 1987; Yamada *et al.*, 1990; Yoon & Konstantinov, 1994; Kussow *et al.*, 1995; Eyer *et al.*, 1995; Singh, 1996; Jorjani & Ozturk, 1999). Para obtener una determinación de la VCO de manera automática y en línea con el método dinámico, Singh (1996) purgó el cabezal del bioreactor con nitrógeno y determinó la disminución del OD. Aunque los datos fueron similares a los obtenidos por otros autores, la metodología es impráctica a escala industrial ya que el purgado requiere mucho tiempo y el número de posibles determinaciones de la VCO se reducen. Asimismo, van Dissel *et al.* (1986) y Kimura *et al.* (1987) emplearon un dispositivo externo para la determinación de la VCO en células humanas obteniendo resultados altamente reproducibles, utilizando una baja concentración de células por muestra y determinando los efectos de inhibidores metabólicos sobre la VCO y la velocidad específica de crecimiento (μ).

2.8 Sustratos y Metabolitos

2.8.1 Sustratos: Glucosa y Glutamina

La determinación y caracterización cinética del consumo de sustratos es importante para un mejor conocimiento del comportamiento de las células en cultivo.

Los sustratos de mayor concentración en el cultivo de células animales son la glucosa y la glutamina (Butler & Jenkins, 1989). Ambos sustratos proveen energía para el metabolismo y son precursores de biomasa. El metabolismo de la glucosa provee energía a través de la glicólisis, del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TAC), de la fosforilación oxidativa y por la vía de las pentosas. A través de ésta última vía se generan precursores para la síntesis de ácidos nucleicos (Zielke *et al.*; 1976). Se ha reportado que células proliferantes y transformadas poseen un alto flujo de glucosa a lactato (glicólisis aeróbica), a pesar de que consumen oxígeno normalmente y poseen enzimas mitocondriales en niveles adecuados para oxidar el piruvato. (McKeehan, 1982).

Adicionalmente, en cultivos de células HeLa sin glucosa, pero suplementados con altos niveles de uridina y citidina, se ha observado la utilización de los esqueletos de carbono de estas moléculas para suplir las necesidades de las células en cultivo (Wice *et al.*, 1981). Reportes similares a estos, establecieron que la glucosa no es esencial para la proliferación y se planteó la existencia de fuentes energéticas alternas. Los aminoácidos son la fuente de carbono reducido más abundante después de los carbohidratos tanto, en el plasma sanguíneo y en los medios de cultivo de células de mamífero. Específicamente la glutamina es el aminoácido de mayor proporción en el plasma, en tejidos en general y en los medios de cultivo. Se ha establecido una correlación entre la actividad de las glutaminasas mitocondriales y la malignidad de los hepatomas, lo cual ha permitido sugerir que la glutamina puede ser una importante fuente energética de los tumores. De igual manera, se ha sugerido a la glutamina como fuente de energía de células proliferantes normales *in vivo* como enterocitos, reticulocitos y en lentes epiteliales (McKeehan, 1982).

La glutamina suministra carbono y nitrógeno para la síntesis de ácidos nucleicos. Puede sufrir oxidación completa hasta CO₂ o una oxidación parcial, denominada glutaminólisis (McKeenan, 1982), que genera moléculas de 3 y 4 carbonos como lactato, alanina o aspartato. Posiblemente,

la glutamina entra al ciclo TAC como 2-oxoglutarato y sale de la mitocondria como malato, el cual es convertido en el citoplasma en las moléculas mencionadas. Este proceso podría incrementar la relación de NADH/NAD en el citoplasma lo que induciría a la producción de lactato vía glicólisis (Lanks, 1986). Se ha determinado en hibridomas murinos de linfocitos B que la glicólisis provee el 59% de la energía y la glutaminólisis genera el 40% del total de energía requerida por la célula (Petch & Butler, 1994). Además, la glutamina es esencial para la transformación linfoblástica, la diferenciación de células plasmáticas y la producción de inmunoglobulinas. Se ha planteado que la glutamina podría afectar el desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y por ende, la formación de glucosamina-6-fosfato para la glicosilación o indirectamente por la activación de células accesorias (Crawford & Cohen, 1985).

Se ha estudiado ampliamente la interacción entre la glucosa y la glutamina en diferentes células. En linfocitos de rata, la presencia de uno de los sustratos afecta la oxidación del otro y viceversa. Pero en células formadoras de colonias, la glutamina afecta el metabolismo de la glucosa pero, la glucosa no modifica las velocidades de consumo de la glutamina (Ardawi & Newsholme, 1983).

Se ha planteado que células proliferantes normales y tumorales poseen altas velocidades glicolíticas y glutaminolíticas, no solo para provisión energética sino también para generar precursores a altas velocidades para la síntesis de macromoléculas, cuando la proliferación así las requiera (Medina & Nuñez De Castro, 1990).

2.8.2 Metabolitos: Lactato y Glutamato

El lactato es generado por los metabolismos de la glucosa (glicólisis) y de la glutamina (glutaminólisis) y puede inhibir el crecimiento de células de mamífero cuando se encuentra en altas concentraciones en el medio. Sin embargo, Patel *et al.* (2000) en cultivos no alimentados de CH de SCUH mostraron que el control de pH es necesario pero no suficiente para eliminar la inhibición del crecimiento celular y del metabolismo por la acidificación del medio, e indicaron que otros factores inhibidores no determinados participan en este efecto.

Se ha reportado que células con altas velocidades específicas de crecimiento *in vivo* como las CH de SCUH, muestran altas velocidades de consumo y producción de glucosa y lactato,

respectivamente, a diferencia de células con velocidades específicas de crecimiento menores. Sin embargo existen reportes contradictorios del comportamiento mencionado en cultivos de CH de SCUH. Collins *et al.* (1997) encontraron una correlación entre el porcentaje de CFC⁺ y la velocidad específica de producción de lactato (q_{Lac}) en una amplia variedad de condiciones de cultivo de CH de SCUH. De manera diferente Collins *et al.* (1998a), reportaron que las células maduras y no las progenitoras hematopoyéticas indiferenciadas son las que generan una mayor concentración de lactato al medio, lo que indica que obtienen una mayor proporción de su energía a través de la glicólisis.

Adicionalmente, la glutamina se descompone tanto por vía química como enzimática. La descomposición química de la glutamina genera amonio y ácido pirrolidón carboxílico. En cambio, la degradación enzimática por la presencia de glutaminasas presentes en el suero fetal bovino adicionado al medio, produce amonio y glutamato (Ozturk & Palsson, 1990). A pesar de ser el glutamato un metabolito importante de uno de los sustratos del cultivo de CH de SCUH solo existe en la literatura un reporte escueto de la generación de este metabolito en tales cultivos (López, 1999).

Aunque no existe información profusa del comportamiento cinético del glutamato en CH de SCUH, éste ha sido ampliamente estudiado como un neurotransmisor de excitación en el sistema nervioso central (SNC). También se ha descubierto que el glutamato funciona como una molécula de señalización en varios tejidos del cuerpo diferentes al SNC, como en hueso, queratocitos de piel, células β del páncreas y en megacariócitos de MO (Skerry & Genever, 2001). La expresión de receptores para glutamato y otros componentes de las sinapsis sugieren una función paracrina del glutamato. De igual manera, se ha reportado la existencia de un transportador de glutamato en hueso y la expresión de diferentes subtipos de receptores de glutamato en osteoclastos y osteoblastos (Chenu *et al.*, 1998). Lo anterior ha permitido plantear a algunos autores, que el glutamato podría ser un importante regulador local de las funciones óseas. Además, se han identificado estructuras similares a nervios que poseen glutamato y corren adyacentes a las trabéculas del hueso en la vecindad de las células hematopoyéticas y de los ostocitos, lo que ha permitido sugerir la existencia de una inervación glutamatonérgica en el hueso (Serre *et al.*, 1999).

Unido a lo anterior, se ha reportado actividad de receptores de glutamato durante la diferenciación celular de osteoblastos. Lo cual es una evidencia de la intervención del glutamato en la señalización intracelular del hueso (Skerry & Genever, 2001). Adicionalmente, se ha determinado en megacariócitos altos niveles de expresión del receptor de glutamato, identificado con el agonista de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato). Este receptor, podría estar involucrado en la regulación de la actividad y agregación plaquetaria, ya que se han encontrado receptores NMDA funcionales en plaquetas (Genever *et al.*, 1999; Franconi, 2000).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el planteamiento de la SCUH como una fuente rica de CH, se han diseñado y realizado diversas investigaciones y procedimientos clínicos, que han corroborado la potenciabilidad de esta sangre para el restablecimiento del proceso hematopoyético en individuos con diversas enfermedades hematológicas o inmunosuprimidos. Experimentos efectuados por grupos multidisciplinarios de investigadores como, médicos, hematólogos, biólogos, bioingenieros, etc, han permitidos conocer y establecer metodologías para la identificación de los diferentes grupos celulares y estados de diferenciación, para la recolección, almacenamiento y el cultivo *in vitro* de éstas.

La realización de cultivos *in vitro* ha brindado una alternativa para incrementar las concentraciones de células necesarias para el transplante en individuos adultos, aunque los costos de experimentación son altos por el empleo de citocinas recombinantes. La implementación de parámetros ingenieriles en éstos cultivos y el empleo de sistemas de cultivo como son los birreactores, abrió nuevas y prometedoras posibilidades del escalamiento ascendente de las expansiones *in vitro* y por ende de la obtención de mayores concentraciones celulares. Los birreactores, a diferencia de los sistemas tradicionales de cultivo de células animales como son, las placas multipozo, frascos T, etc, pueden ser escalables, monitoreados y controlados de manera computacional. Algunos investigadores como Palsson *et al.* (1993), Koller *et al.* (1993), Oh *et al.* (1994), Sandstrom *et al.* (1996), Koller *et al.* (1998) y Kim (1998), entre otros, han realizado cultivos en bioreactores de perfusión o agitados lo que les ha permitido obtener importantes expansiones celulares. Sin embargo, la implementación y ejecución de estos cultivos es aún incipiente en México.

El laboratorio del Dr. Tonatiuh Ramírez es pionero en el área de expansión de CH de SCUH empleando parámetros y estrategias bioingenieriles en México. Entre los aportes del grupo se encuentra el establecimiento de las metodologías para la recolección de la SCUH, para la realización de los cultivos tipo Dexter y de los ensayos clonogénicos (López, 1999). Además

López (1999), realizó una caracterización cinética del comportamiento celular a diferentes concentraciones iniciales de sustratos, metabolitos y FBS. De manera similar De León (1999), diseñó, construyó y caracterizó un pequeño birreactor para cultivos lote y en condiciones agitadas de CH de SCUH. Aunque De León, realizó algunos cultivos exitosos en éste bioreactor, se evidenció la necesidad de profundizar en algunos aspectos del conocimiento de estas células, para generar información más amplia del comportamiento metabólico y celular de éstas. Adicionalmente éste autor, encontró en cultivos a 20% y 10% de OD una relación creciente entre la VCO (medida con el método de fase líquida en estado estacionario) y la concentración de progenitores totales. Esta relación detectada de manera similar por Collins *et al.* (1998) en cultivos a 50% de OD, es de empleo potencial para la detección rápida y segura de la concentración máxima de progenitores totales y, una herramienta útil para inferir la edad de cultivo y por ende el tiempo apropiado para cosecharlo. Además De León, con la ayuda de un dispositivo no esterilizable, midió la VCO *ex situ* de estas células. Sin embargo, al no ser esterilizable el dispositivo mencionado, podría arrojar información errónea.

Ante la ya conocida utilidad de la determinación de la VCO en cultivos *in vitro*, la adicional potencialidad reportada de éste parámetro en cultivos de CH de SCUH, los previos ensayos de De León (1999) en la determinación de la VCO *ex situ* y los altos costos de experimentación, se planteó para el presente trabajo, el diseño, construcción y uso de un dispositivo para la medición de la VCO *ex situ* que utilizará el menor volumen de medio de cultivo posible. Este pequeño dispositivo posee como características conspicuas el de ser esterilizable y que permite la calibración sistemática y en condiciones estériles del electrodo de OD. Un equipo con las anteriores cualidades permitirá en el futuro, la realización de diversos ensayos experimentales a diferentes condiciones de cultivo y con la utilidad de poder determinar bajo esas condiciones, un parámetro importante como es la VCO, empleando poco volumen de medio de cultivo y citocinas.

Como se ha mencionado, los altos costos de experimentación hacen imperioso la implementación de estrategias experimentales con bajo consumo de medio de cultivo. De ahí que, se plantee para el presente proyecto, un sencillo modelo experimental de cultivo a condiciones estáticas que permita determinar las cinéticas de las diversas poblaciones celulares hematopoyéticas y de los

sustratos y metabolitos. De esta manera se pretende ahondar en el conocimiento del comportamiento de un modelo biológico complejo, heterogéneo, multifactorial y aún, en muchos aspectos, desconocido.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Caracterizar las poblaciones celulares y el metabolismo básico de cultivos *in vitro* de células hematopoyéticas (CH) de sangre de cordón umbilical humano (SCUH), realizados a condiciones estáticas, mediante la determinación de las cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos principales y producción de desechos metabólicos principales.

4.2 Específicos

Determinar las cinéticas de crecimiento (concentración y viabilidad) de células mononucleares, de progenitores hematopoyéticos y de células adherentes en cultivos lote a condiciones estáticas y realizados en diferentes recipientes de cultivo.

Diseñar y elaborar un dispositivo para la determinación *ex situ* de la velocidad de consumo de oxígeno de CH de SCUH.

Determinar las cinéticas de consumo de sustratos (oxígeno, glucosa y glutamina) y la producción de metabolitos (lactato, glutamato).

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 Recolección de la sangre de cordón umbilical

Las muestras fueron donadas por la Unidad de Gineco Obstetricia del Hospital Regional Familiar No.1 del IMSS – Cuernavaca y los doctores gineco obstétricos Lourdes Ortíz Rodríguez, Carlos Navarro Millá y Fernando Martínez González. Las muestras fueron recolectadas siguiendo el procedimiento descrito en López (1999) e inmediatamente después de ser cortado el cordón umbilical y retirado el recién nacido. La recolección de la sangre se efectuó por gravedad del cordón umbilical unido a la placenta, antes del desprendimiento de ésta.

5.2 Procesamiento para obtención de células mononucleares (MN)

El siguiente protocolo fue realizado en cada una de las muestras de SCUH recolectadas. Se centrifugó la sangre a 200 g durante 15 minutos. La interfase formada (“buffy coat”) se extrajo para obtener las células MN, entre las cuales se encuentran los progenitores hematopoyéticos en diferentes estados de diferenciación celular. A este paquete celular se le añadió 1 ml de solución salina de fosfatos pH 7.2 (PBS: 0.21 g/l KH_2PO_4 , 9.0 g/l NaCl, 0.726 g/l Na_2HPO_4) y se determinó la concentración de células totales y células viables en un hematocitómetro, mediante dilución 1:10 con solución de Turck (3% $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) y con Azul de Tripano (8% Solución azul de tripano T-8154 SIGMA), respectivamente. Para eliminar los eritrocitos remanentes en el “buffy coat”, se realizó un gradiente con Ficoll Paque Plus (17-1440-02 Pharmacia Biotech). Para realizar éste, en un tubo estéril se colocaron 4 ml de PBS y de 3 a 7 ml de Ficoll-Paque Plus por cada 60×10^6 cél MN. Posteriormente, se centrifugó a 400 g durante 22 a 30 minutos. El gradiente obtenido se observa en la figura (5-1).

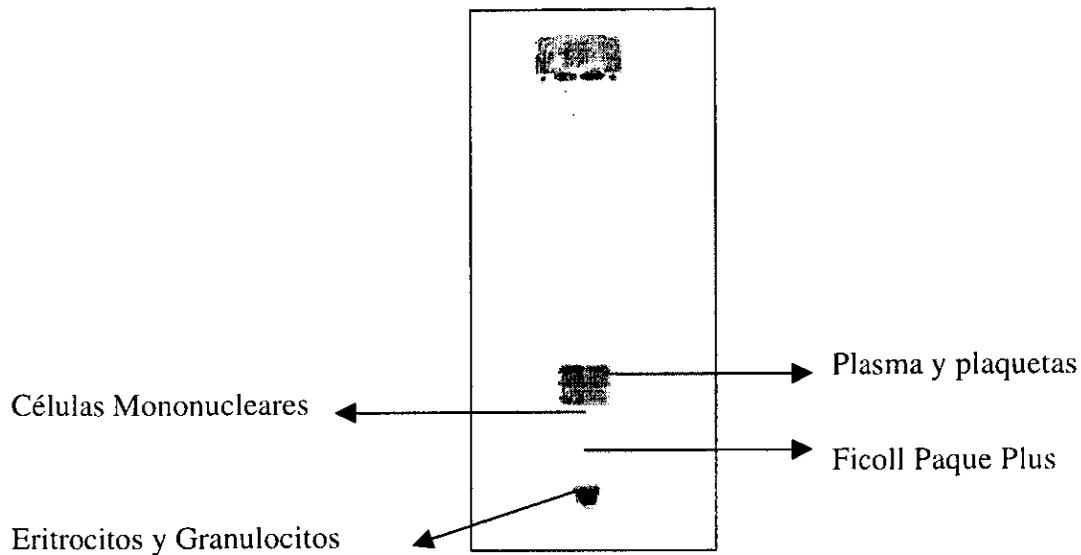


Figura 5-1. Gradiente obtenido con Ficoll-Paque Plus

La capa inmediatamente superior al Ficoll se extrajo, la cual contiene las células MN. Luego se le añadieron 12 ml de PBS y se centrifugaron a 150 g durante 7 min., repitiéndose tal operación en dos ocasiones. El paquete celular con células MN obtenido del último lavado, se resuspendió con 1 ml de medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, I7633 SIGMA) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, 16000-044, Gibco BRL).

5.3 Cultivos de colonias de progenitores hematopoyéticos (ensayos clonogénicos)

Para determinar la concentración y el tipo de progenitores presentes en un tiempo determinado del cultivo se realizaron cultivos en medio basado en metil celulosa (MethoCult, GF H4434, StemCell Technologies Inc.). El MethoCult permite que la progenie clonal de una simple célula progenitora no se disperse, facilitando su identificación. Además, por estar suplementado con citocinas se maximiza el crecimiento y la diferenciación de los progenitores y de su progenie clonal. Se tomaron 3×10^4 o 5×10^4 células MN y se adicionaron a 1 ml de medio MethoCult. La suspensión celular se agitó para homogenizar las células en el MethoCult, se sembró en cajas de petri de 35 mm de diámetro (3035 Costar) y se incubó a 37 °C y 5% CO₂ durante 14 a 17 días.

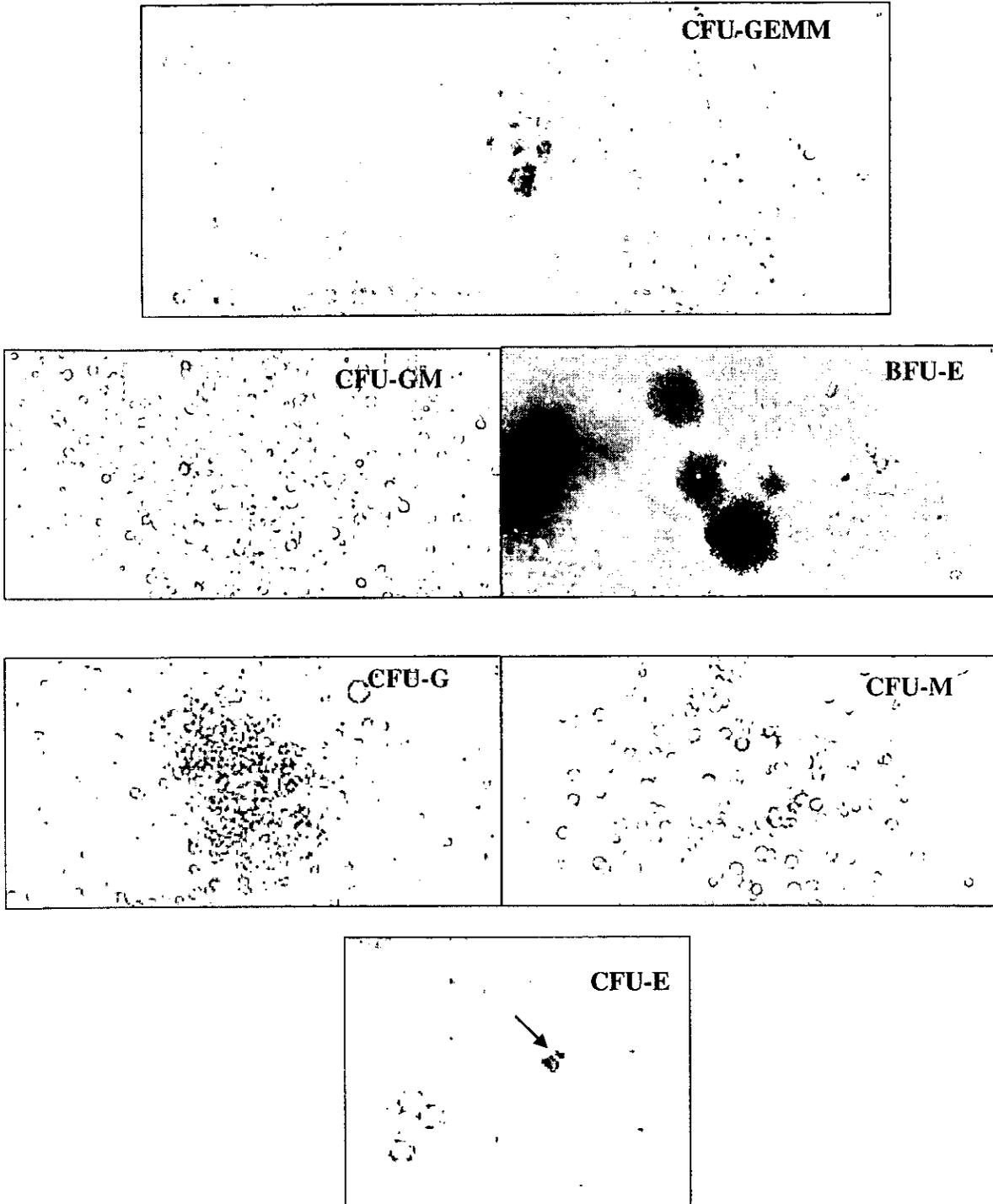


Figura 5-2. Progenitores hematopoyéticos determinados a diferentes edades del cultivo

Transcurrido el tiempo mencionado, con base en las descripciones de diferentes autores (Eaves & Lambie, 1995; Mayani *et al.*, 1998; López, 1999) y empleando un microscopio invertido, se determinaron los progenitores hematopoyéticos. La figura (5-2) muestra los progenitores hematopoyéticos típicos obtenidos.

5.4 Cultivos estáticos

Se empleó como medio de cultivo IMDM suplementado con 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v) de solución antibiótica y antimicótica (A5955 SIGMA, 10000 U/ml penicilina, 10 mg/ml estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B). Además fue suplementado con las siguientes citocinas, en concentraciones similares a las empleadas por De León (1999a): 3 ng/ml interleucina 3 (IL-3, G5531 Promega), 3 ng/ml interleucina 6 (IL-6, G5541 Promega), 8 ng/ml factor de crecimiento de células tallo humanas (SCGF, 100-22 Peprotech), 0.5 ng/ml factor estimulante de colonias granulocíticas monocíticas (GM-CSF, 5429 Probiomed) y 1.5 ng/ml eritropoyetina humana recombinante (EPO, 5235 Probiomed).

Se realizaron cultivos en placas multipozo de 24 pozos (3524 Costar), frascos T de 25 cm² (3055 Costar), frascos T de 75 cm² (3075 Costar) y cajas petri de 35 mm de diámetro (3035 Costar) con diferentes volúmenes de medio y a un inóculo de 2×10^5 células MN/ml (Tabla 5-1). Los recipientes fueron incubados a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Tabla 5-1. Volumen de medio de cultivo empleado en los distintos recipientes

<i>Recipiente</i>	<i>Volumen (ml)</i>	<i>n</i>
Placa multipozo	1.0	8
Frasco T 25 cm ²	12.0	3
Frasco T 75 cm ²	30.0	16
Caja petri ^a	4.0	4
Caja petri ^b	2.5	4

n: número de cultivos (muestras) realizados en el sistema. ^a: Volumen 4.0 ml. ^b: Volumen 2.5 ml

5.5 Obtención de células adherentes

Se empleó la técnica descrita en López (1999) para 3 de las muestras. Sin embargo en 10 muestras, con el objeto de aumentar la recuperación de las células adherentes, se utilizó la técnica mencionada pero realizando la incubación con tripsina-EDTA (25300-062, Gibco BRL) durante 10 minutos y su inactivación con FBS, en 3 ocasiones consecutivas. En contraste con la metodología indicada, en la cual solo se realizó una incubación con Tripsina-EDTA. Las células fueron retiradas con un raspador (3010 Costar) durante cada ciclo de incubación/inactivación y, se colectaron en un tubo estéril. Posteriormente, se centrifugaron a 150 g durante 5 minutos para remover la tripsina. Luego, se cuantificaron las células MN y se realizaron ensayos clonogénicos, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

5.6 Descripción de la cámara (respirómetro) diseñada para la determinación de la velocidad de consumo de oxígeno *ex situ*

Un recipiente de vidrio con 4 ml de capacidad y con una salida lateral se acopló, mediante un conector de acero, a un electrodo polarográfico (Ingold, 12 x 320 mm) de medición de OD (Figura 5-3 y 5-4). Para realizar las determinaciones de la VCO a diferentes edades de los cultivos realizados en cajas petri, se tomó todo el medio de una caja y se colocó en la cámara de vidrio mencionada.

El diseño de la cámara aseguró la total eliminación de la fase gaseosa permitiéndole la determinación de la VCO por el método dinámico (Ver ecuación 2-9), tal y como se expuso en *Antecedentes*. Además, el diseño del dispositivo permite que éste sea esterilizado y el electrodo de OD calibrado, para cada determinación de la VCO. El oxígeno disuelto se reportó como porcentaje de saturación con respecto al aire en agua a 37 °C y la señal del electrodo se amplificó mediante un amplificador (170% aire Ingold) y se adquirió en un computador Macintosh LC a través de convertidores análogos/digitales (A/D) de una tarjeta de interfase 411 (GW Instruments). Detalles del sistema de adquisición de datos se han descrito anteriormente (Aguila *et al.*, 1993).

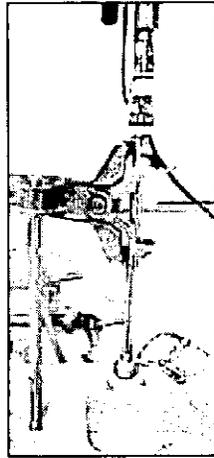


Figura 5-3. Respirometro diseñado y empleado para las determinaciones *ex situ* de VCO

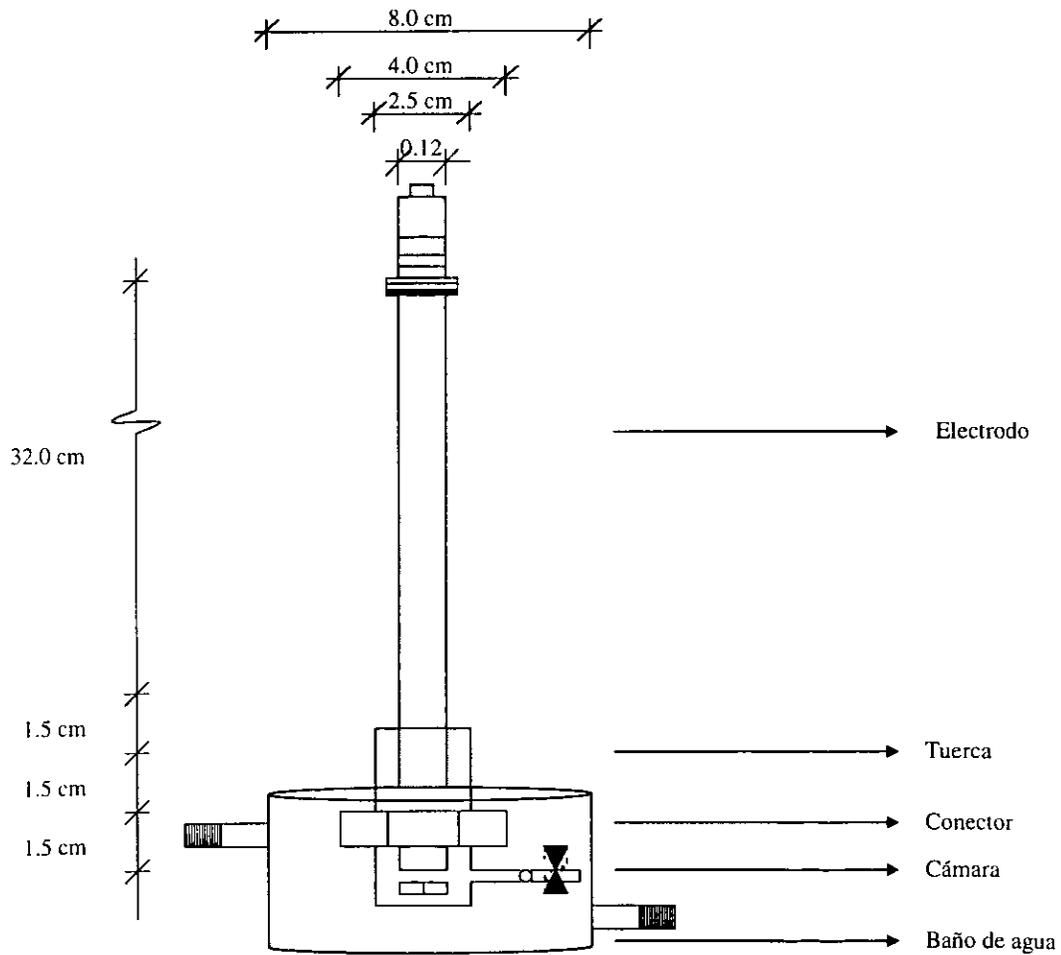
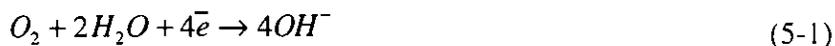


Figura 5-4. Esquema del respirometro diseñado y empleado para las determinaciones *ex situ* de VCO.

5.7 Determinación del consumo de oxígeno por el electrodo

Según el principio electroquímico de la medición del OD cuando se aplica un potencial entre dos electrodos inmersos en una solución salina diluida, el oxígeno es reducido. Las reacciones para el cátodo de platino y para el ánodo de plata se muestran en las ecuaciones (5-1) y (5-2) respectivamente, en donde se observa el consumo de oxígeno por el cátodo durante la reacción química (Kilburn, 1990).



De acuerdo con lo anterior, para determinar el consumo de oxígeno por el cátodo se utilizó el mismo procedimiento descrito en el punto anterior en medio con SFB 10%, pero en este caso no se le adicionaron células.

5.8 Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno de hibridomas

Para corroborar los resultados de la VCO de las CH de SCUH obtenidos con el respirómetro se utilizó como modelo experimental la línea de hibridomas BCF-2 (Zamudio *et al.*, 1992) cuya VCO esta ampliamente reportada. Esta línea se empleó para realizar diferentes ensayos durante las determinaciones de VCO *ex situ*.

Para tener una idea de la posible ubicación de las células dentro del dispositivo, se calculó el tiempo necesario para que las células se sedimentaran en éste. Se utilizaron los conceptos de velocidad terminal para calcular el tiempo máximo requerido para la sedimentación de éstas y específicamente, se utilizó la metodología sugerida en Wilson *et al.* (1992) para realizar tales cálculos (Ver Apéndice A). La velocidad terminal obtenida fue de 1.5 $\mu\text{m/s}$ (calculada para un diámetro 18 μm correspondiente a los proeritroblastos y a los hibridomas, una densidad (ρ) de partícula de 1.0144 g/cm^3 , un factor de forma de 0.26 correspondiente a partículas de forma irregular y viscosidad cinemática (μ/ρ) de $1.0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$) y considerando que la altura del medio en el respirómetro fue de 1.5 cm, se determinó que el tiempo máximo en que las partículas (células) llegaban al fondo del respirómetro fue de aproximadamente de 20 minutos.

Sabiendo que las células se sedimentan en la base del respirómetro a 20 minutos máximo, se realizaron determinaciones de VCO colocando el electrodo dentro del respirómetro a 10 mm y a 1.0 mm de la base del respirómetro y con agitación a 30 rpm con un magneto de 7 mm x 2 mm.

Adicionalmente, se determinó el efecto de la agitación sobre la viabilidad al comparar la viabilidad celular cuantificada al final del procedimiento con los valores contabilizados de éste parámetro al inicio del procedimiento.

5.9 Métodos analíticos

5.9.1 Cuantificación de células mononucleares y células viables

Como se mencionó anteriormente, para la contabilización de células mononucleares se diluyó la suspensión celular en solución de Turck a una concentración de 1:10 para lisar los eritrocitos, y el conteo de células se realizó en hematocitómetro de Neubauer. La viabilidad se determinó empleando el colorante azul de tripano como diluyente de la suspensión de células MN (1:10) ya que, las células viables excluyen el colorante mientras que las células no viables se tiñen de azul (Huerta, 2000; Butler, 1990).

5.9.2 Determinación de glucosa, glutamina, lactato y glutamato

Las concentraciones de glucosa, glutamina, glutamato y lactato fueron determinadas mediante un analizador bioquímico YSI (2700 Select, Yellow Springs Instrument Co., Inc.). El analizador emplea membranas con oxidasas inmovilizadas específicas para los distintos metabolitos. El producto de la reacción enzimática es el peróxido de hidrógeno, el cual es electroquímicamente oxidado en el anodo del equipo, generando una señal eléctrica. La señal eléctrica generada es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y por lo tanto a la concentración del sustrato ó metabolito analizado.

Todas las determinaciones son directas exceptuando la de la glutamina, la cual es convertida a glutamato mediante la glutaminasa y posteriormente a peróxido de hidrógeno mediante la L-glutamato oxidasa. En la determinación simultánea de L-glutamina y L-glutamato en el YSI la concentración de L-glutamina es estequiométricamente igual a la concentración de L-glutamato total (el presente inicialmente en la muestra más el generado a partir de la L-glutamina por la

acción de la glutaminasa) menos la concentración de L-glutamato presente inicialmente en la muestra (Villaseñor, 1998).

5.10 Parámetros cinéticos

5.10.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento (μ) se refiere a la velocidad de crecimiento por célula, determinada durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo donde se considera constante.

La μ se calculó de acuerdo con la ecuación (5-3).

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t \quad (5-3)$$

- μ : Obtenida de la pendiente de la recta $\ln x/x_0$ contra tiempo
- x : Concentración celular en el tiempo i en la fase exponencial
- x_0 : Concentración celular en el tiempo cero del cultivo

5.10.2 Proliferación celular

Es el número de células totales producidas y diferenciadas a partir de una célula (Mayani & Lansdorp, 1998). Se calculó según la ecuación (5-4),

$$Proliferación = \frac{x_{m\acute{a}x}}{x_0} \quad (5-4)$$

- $x_{m\acute{a}x}$: Concentración máxima de células MN detectada en el cultivo
- x_0 : Concentración de células MN inicial

5.10.3 Expansión celular

Es el número total de progenitores generados a partir de un progenitor (Mayani & Lansdorp, 1998). En el presente trabajo se determinó la expansión máxima del cultivo, la cual se calculó según la ecuación (5-5),

$$Expansión = \frac{CFU_{m\acute{a}x}}{CFU_0} \quad (5-5)$$

$CFU_{m\acute{a}x}$: Concentración máxima de Unidades Formadoras de Colonias detectada en el cultivo

CFU_0 : Concentración inicial de Unidades Formadoras de Colonias de Progenitores

5.10.4 Velocidad específica del consumo o producción de sustratos o productos (q_i)

El consumo o la producción específica de sustratos o productos respectivamente se calculó a partir de la concentración de sustratos o metabolitos obtenidos durante la fase exponencial siguiendo la ecuación (5-6),

$$q_i = \frac{\left[\frac{dS}{dt} \right]}{x_i} \quad (5-6)$$

q_i : Consumo específico del sustrato i o producción específica del producto i

S_i : Concentración de sustrato i o producto i

\bar{x} : Promedio concentración de células MN en el tiempo i

t : Tiempo

5.10.5 Consumo de glutamina

En estudios metabólicos del cultivo *in vitro* de células de mamífero es importante tener en cuenta la descomposición química de la glutamina. La degradación química depende de varios factores como son, la concentración inicial de glutamina, el inoculo y las velocidades de crecimiento y de descomposición. Se ha demostrado que ignorar esta descomposición puede generar un error del 200% al 300% en la determinación del consumo específico de la glutamina (Ozturk & Palsson, 1990).

Para determinar las velocidades específicas de consumo de glutamina, se empleo la ecuación (5-7) planteada por Ozturk & Palsson (1990),

$$\frac{q_{Gln}}{q_{Gln}'} = (1 + \alpha) \frac{\beta(1 - \gamma) - \beta(1 - (\beta(1 - \gamma))^{-\alpha}) - 1}{\beta(1 - \gamma) - (\beta(1 - \gamma))^{-\alpha}} \quad (5-7)$$

Donde, q_{Gln} es la velocidad específica de consumo de glutamina real y q_{Gln}' es la velocidad específica de consumo de glutamina aparente. Esta última, representa la pendiente de la regresión

lineal obtenida al graficar la concentración de glutamina vs concentración celular, durante la fase exponencial. El cociente entre las dos entidades mencionadas indica el error introducido por ignorar la descomposición de la glutamina. Este cociente es gobernado por tres parámetros adimensionales como son, α , β y γ . La representación numérica de estos parámetros es:

$$\alpha = \frac{k}{\mu} \qquad \beta = \frac{\mu [Gln]_0}{q_{Gln} X^0} \qquad \gamma = \frac{[Gln]}{[Gln]_0} \qquad (5-8)$$

Donde, la constante k de descomposición de la glutamina y es calculada de acuerdo con la ecuación (5-9), $[Gln]_0$, es la concentración inicial de glutamina, X^0 , es el inoculo y, $[Gln]$ es la concentración de glutamina remanente al final de la fase exponencial.

$$\ln k = a + b\text{pH} \qquad (5-9)$$

Donde, a y b son coeficientes calculados por los autores mencionados de acuerdo con el tipo de medio de cultivo empleado en los cultivos.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características de las muestras

Se procesaron 37 muestras de sangre de cordón umbilical, 18 producto de cesárea y 19 de parto natural. La tabla (6-1) reúne el volumen obtenido, las concentración de células MN no fraccionadas (*buffy coat*) y fraccionadas, en los diferentes fases del procedimiento.

Tabla 6-1. Concentración de células en las distintas fases de procedimiento. mediana (rango)

<i>Tipo de parto</i>	<i>Volumen Recolectado (ml)</i>	<i>Células no fraccionadas "Buffy coat" ($\times 10^6/\text{ml}^*$)</i>	<i>Células Fraccionadas "Célulasmononucleares" ($\times 10^6/\text{ml}^*$)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
Naturales y Cesáreas (n=37)	30 (9 y 48)	4.5 (0.3 y 18.9)	0.8 (0.04 y 3.1)	30 (9 y 48)
Naturales (n=19)	30 (9 y 40)	8.3 (0.3 y 14.4)	0.9 (0.2 y 3.1)	30 (9 y 40)
Cesáreas (n=18)	35 (30 y 48)	2.1 (0.8 y 18.9)	0.4 (0.04 y 2.4)	35 (30 y 48)

Se informa en las columnas la mediana y entre paréntesis el valor mínimo y máximo de los datos de cada categoría. n: número de muestras. ml^{*}: mililitros de sangre recolectada

Los volúmenes obtenidos fueron suficientes para obtener el número de células requeridos para los experimentos de éste proyecto, sin embargo menores a los reportados por otros autores. Los volúmenes de la SCU reportados varían en un intervalo de 4 a 200 ml, tal y como lo han expuesto Broxmeyer *et al.* (1989), López (1999) y Belvedere *et al.* (2000), entre otros, quienes obtuvieron 56.3 ± 2.4 ml; 39.8 ± 8.9 ml y 46.7 ± 25.6 ml, respectivamente. Estos autores emplearon el mismo método de recolección de SC, que fue por gravedad del cordón umbilical del extremo de la madre previo al alumbramiento (desprendimiento) de la placenta. Según Donaldson *et al.* (1999) las variaciones reportadas dependen de distintos factores obstétricos que influyen en el rendimiento de la colección final, como son, el tiempo de gestación, peso del infante, tiempo entre el parto y el pinzado del cordón, longitud del cordón, posición del pinzado y nivel del recién nacido con respecto a la placenta antes y en el momento del pinzado. El número de células no fraccionadas por ml de sangre recolectada fue similar al reportado por López (1999) y, 1.3 veces

mayor que el reportado por Broxmeyer *et al.* (1989). El porcentaje de recuperación de células fraccionadas ($24.7\% \pm 19.0$) fue 1.6 veces menor que el reportado por López (1999) y 1.6 veces mayor que el obtenido por Broxmeyer *et al.*, (1989), respectivamente. Estas diferencias podrían ser generadas por la concentración y la variante de Ficoll empleado (Hypaque/Plaque), la realización o no de los lavados con PBS y la solución empleada para la resuspensión de las células extraídas. Sin embargo, Broxmeyer *et al.* (1989) no especificaron la concentración de Ficoll empleada, ni la realización de lavados, ni la solución utilizada para resuspender las células de interés. No obstante, existió diferencia entre la concentración de Ficoll empleada en el presente trabajo y en el de López (1999). Esta diferencia, podría ser la causa de los distintos porcentajes de recuperación determinados en ambos estudios.

Adicionalmente en la tabla (6-1), se observa la obtención de una mayor concentración de las células no fraccionadas de los partos naturales que de los partos de cesárea. Estas diferencias de concentración celular puede estar íntimamente ligada con los planteamientos anteriormente mencionados.

6.2 Características de las células hematopoyéticas de SCUH

Como se observa en la figura (6-1), la determinación del tipo de progenitores presentes en el día de siembra (día = 0) de la muestra fueron muy similares a los obtenidos por López (1999), diferentes a los reportados por Broxmeyer *et al.* (1989) y con diferencias en el número de CFU-G y CFU-GM con los datos reportados por Mayani & Lansdorp (1998). Las diferencias observadas entre los resultados reportados por los mencionados autores, están muy relacionadas con las diferencias entre el medio y las citocinas utilizadas para la realización de los ensayos clonogénicos. Como lo han demostrado Broxmeyer *et al.* (1989) la detección de progenitores hematopoyéticos depende de la combinación de citocinas usada para los ensayos clonogénicos.

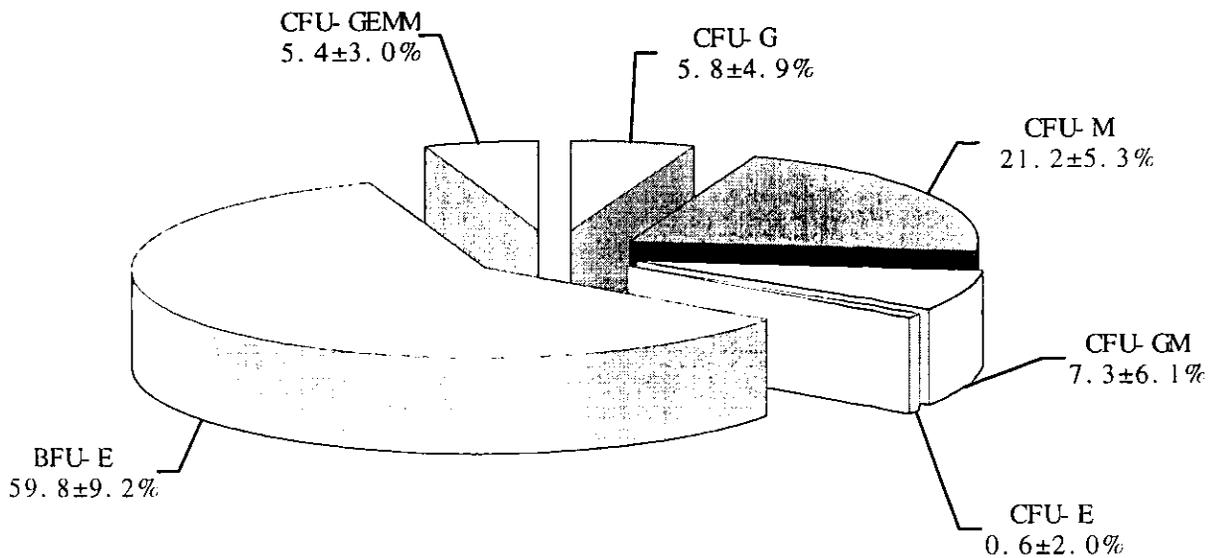


Figura 6-1. Porcentaje de progenitores hematopoyéticos de muestras de SCU en el día de siembra de los cultivos (día = 0). n=37

El planteamiento anterior se corrobora con la alta similitud de los resultados de este proyecto con los expuestos por López (1999), debido a que los ensayos clonogénicos que se realizaron en el presente trabajo, siguieron el mismo protocolo que el del autor mencionado. De ésta manera, se puede suponer que las concentraciones de progenitores hematopoyéticos reportados, serían las típicas obtenidas de sangre de cordón umbilical de neonatos de mujeres mexicanas que asisten al centro de salud empleado en ambos estudios, siguiendo los mismos protocolos de recolección de muestra y de realización de ensayos clonogénicos. Sin embargo, estas concentraciones podrían variar al cambiar los protocolos mencionados y la población de donantes de la SCUH.

6.3 Determinación del consumo de oxígeno por el electrodo de oxígeno disuelto

Como se observa en la figura (6-2) se corroboró el bajo consumo de oxígeno por el electrodo y se definió el tiempo óptimo para la determinación de la VCO medida *ex situ* con la cámara elaborada. Después de 60 minutos de estar adquiriendo datos se obtuvo una señal relativamente estable. Como se puede observar al comienzo de la lectura se obtuvo un aumento del OD, muy relacionado con una temperatura menor del medio, el cual fue calentándose gracias al baño de

agua en el cual estaba inmerso. Para garantizar que la disminución del OD correspondía a la respiración celular y no a cambios en la temperatura, se decidió esperar 60 minutos antes de realizar las mediciones.

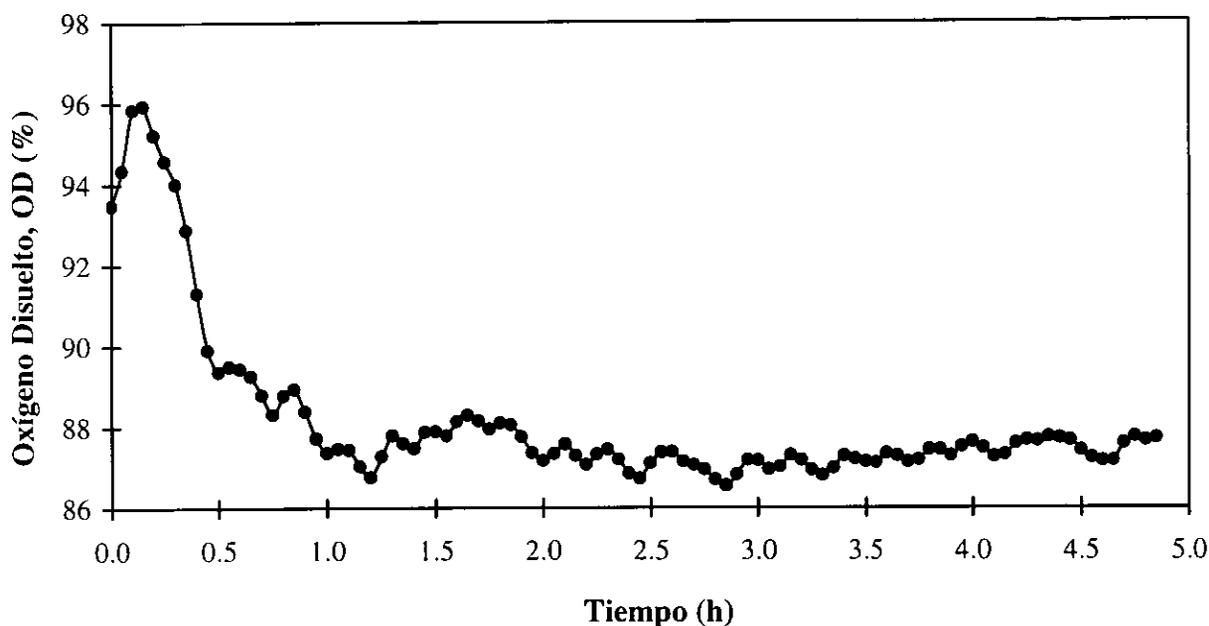


Figura 6-2. Comportamiento del OD con respecto al tiempo en medio IMDM+10%SFB sin células determinado en el respirómetro.

6.4 Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno de la línea BCF-2 de hibridomas

Como se estableció en *Materiales y Métodos*, se empleó la línea de hibridomas BCF-2 para corroborar los valores de VCO obtenidos con el respirómetro diseñado, dada la abundancia de reportes que existen al respecto en la literatura. A continuación se mencionan los resultados obtenidos.

Como se mencionó, el tiempo máximo de sedimentación calculado de las células dentro del respirómetro fue menor al tiempo empleado para realizar las determinaciones *ex situ*. Este resultado permitió conocer que las células se encontraban sedimentadas en el fondo del recipiente al momento de determinar la VCO y no suspendidas y cercanas a la membrana del electrodo de OD.

6.4.1 Efectos posición del electrodo en el dispositivo

Se puede observar en la tabla (6-2) que no se obtuvieron diferencias en la q_{O_2} de hibridomas al cambiar el electrodo de posición dentro de la cámara y los valores fueron menores a los reportados por otros autores (Ramírez & Mutharasan, 1992). Estos resultados podrían estar relacionados con el tamaño de la capa límite formada en el electrodo o por la no homogenización del medio. Lo anterior, planteó la necesidad de agitar durante las determinaciones de la VCO. Adicionalmente, se cuantificó el efecto de la agitación sobre la viabilidad celular y la q_{O_2} .

Tabla 6-2. Efecto de diferentes posiciones del electrodo en el dispositivo sobre la q_{O_2} de hibridomas

Condición	q_{O_2} (mmoles/cél/h)
Electrodo a 1.0 mm del fondo	3.18×10^{-11} a 7.5×10^{-11}
Electrodo a 10.0 mm del fondo	4.47×10^{-11}

6.4.2 Efectos de la agitación durante las determinaciones *ex situ* de la VCO

Se calculó que durante las determinaciones de VCO *ex situ* sin agitación la viabilidad disminuyó 0.41%/h. Mientras que, con agitación la viabilidad disminuyó 1.96%/h, cantidad que es insignificante para tiempos tan cortos. Los resultados obtenidos permitieron establecer que durante las determinaciones de VCO *ex situ* con agitación la q_{O_2} aumentó 2.2 veces con respecto a los valores determinados sin agitación. Es importante destacar que la aplicación de la agitación permitió registrar una VCO y una q_{O_2} comparables a los reportados por otros autores (Ramírez & Mutharasan, 1990), quienes obtuvieron la q_{O_2} variando en el intervalo de 3.3×10^{-10} a 3.7×10^{-10} mmoles O_2 /cél/h.

Los resultados anteriores, indican la importancia de agitar a 30 rpm durante las determinaciones de VCO *ex situ* para homogenizar el medio en el respirómetro, suspender las células para acercarlas a la superficie de la membrana del electrodo y disminuir la capa límite que se forma en el electrodo de OD. Con esto se logró obtener registros verdaderos del cambio de OD en el medio y sin una disminución importante de la viabilidad celular.

6.5 Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno de las CH de SCUH

Los resultados de la q_{O_2} obtenidos de los hibridomas permitieron establecer la pertinencia de la metodología para determinar *ex situ* la VCO. Antes de comentar los resultados obtenidos de VCO, es importante resaltar que en el presente trabajo, se supone que no hubo un efecto importante sobre la viabilidad de las CH de SCUH por retirarlas de su recipiente de cultivo y colocarlas delicadamente en el respirómetro.

La tabla (6-3) reúne el intervalo de veces de incremento o disminución de cada uno de los parámetros evaluados durante la determinación de la VCO *ex situ* de CH de SCUH con agitación de 30 rpm con respecto a los valores de estos parámetros obtenidos durante la determinación sin agitación.

Tabla 6-3. Efecto sobre la viabilidad, la VCO y la q_{O_2} de CH de SCUH al agitar durante la determinación de la VCO *ex situ*.

<i>Viabilidad</i> (%/h)	<i>VCO</i> (mmoles/l/h)	<i>q_{O₂}</i> (mmoles/l/h)
Disminuyó	Aumentó	Aumentó
0.39 a 2.39 veces	0.33 a 1.27 veces	0.5 a 1.5 veces

Como se observa en la tabla (6-3), la viabilidad de las CH disminuyó en un intervalo de 0.39 a 2.39 %/h veces con respecto a la viabilidad cuantificada en las determinaciones de VCO sin agitación. Es importante destacar que la viabilidad de las CH de SCUH durante la determinación de la VCO *ex situ* sin agitación disminuyó en un intervalo de 0.25 a 10.03 % /h, de tal manera, la máxima disminución de la viabilidad durante las determinaciones de VCO con agitación fue de 24 %/h, para una de las muestras. De acuerdo con los resultados obtenidos de VCO y de disminución de viabilidad por la agitación, se plantea que en la determinación de la VCO *ex situ* la agitación puede ser de 30 rpm. Posiblemente, aunque no se realizó en este proyecto, agitaciones superiores a 30 rpm generarían una mayor disminución de la viabilidad y por ende, de las células presentes durante la determinación, produciendo errores en la medición.

Adicionalmente en la tabla (6-3), se muestra que la determinación de la VCO con agitación permitió obtener valores de q_{O_2} en el intervalo de 0.5 a 1.5 veces mayores a los q_{O_2} obtenidos sin agitación. Como se expuso anteriormente, esta diferencia posiblemente se deba a los cambios originados en la capa límite formada sobre la superficie de la membrana del electrodo. En la fase exponencial del crecimiento de los progenitores hematopoyéticos totales se obtuvieron valores de q_{O_2} en el intervalo de 3.17×10^{-11} a 1.13×10^{-10} $\text{mmolesO}_2/\text{cél/h}$, los cuales son muy similares a los reportados por otros autores en diferentes sistemas de cultivo y empleando otros métodos de determinación de VCO, como se muestra en la tabla (6-4) (De León, 1999; Collins *et al.*, 1998a; Peng & Palsson, 1996).

Tabla 6-4. Comparación de distintos valores de q_{O_2} de CH de SCUH reportados por diferentes autores

Tipo de cultivo	q_{O_2} (mmoles/cél/h)	Método	Referencia
Caja petri	3.17×10^{-11} a 1.13×10^{-10}	Dinámico	Presente trabajo
Bioreactor	4.30×10^{-10} (CFC ⁺) 0.57×10^{-10} (CFC ⁻)	Fase líquida en estado estacionario	De León, 1999
Bioreactor	1.70×10^{-11} a 1.20×10^{-10}	Fase líquida en estado estacionario	Collins <i>et al.</i> , 1998a
Placa 6 pozos	3.8×10^{-11} (Adherentes) 2.50×10^{-11} (No adherentes)	Dinámico	Peng & Palsson, 1996

6.6 Relación creciente entre los progenitores totales y la VCO

Los resultados obtenidos durante las determinaciones *ex situ* de la VCO permitieron establecer que el mayor valor de VCO se presentó cuando se detectó la mayor población de progenitores totales (Figura 6-3), tales resultados concuerdan con lo reportado por Collins *et al.*, (1998a) y De León, (1999). Esta relación puede ser una herramienta potencial para detectar los progenitores totales en poco tiempo y en poco volumen de medio, en contraste con los 14 días necesarios para obtener la información del número de progenitores empleando la técnica convencional con medio basado en metilcelulosa.

Es importante destacar que la máxima VCO determinada no coincide con la máxima proliferación de células mononucleares, lo que permite asegurar que las máximas VCO fueron determinadas en los tiempos de mayor número de progenitores hematopoyéticos totales, ya que las máximas concentraciones de células MN y de progenitores totales se presentaron a diferentes edades de cultivo (Figura 5-4). Es importante resaltar, que la relación creciente planteada entre los progenitores totales y la VCO es válida solamente durante la fase exponencial, en los primeros días de cultivo a las condiciones realizadas en éste trabajo. Como se observa en la (Figura 6-4), a una mayor edad de cultivo se registraron valores altos de VCO, a un tiempo en que no se detectaron progenitores hematopoyéticos. Posiblemente a esa edad de cultivo se desarrollaron formas celulares, como macrófagos, que consumen oxígeno a una VCO mayor que la de los progenitores hematopoyéticos.

6.7 Velocidades específicas de consumo de oxígeno de las diferentes poblaciones celulares

En el cultivo hay una multiplicidad de formas celulares y estados de diferenciación, con diferencias no solo morfológicas sino también fisiológicas que implican distintos estados y velocidades metabólicas, en donde cada célula consume oxígeno a diferentes velocidades. Para discernir un poco más y obtener información de los diversos niveles de respiración, se retomó el modelo bipoblacional planteado por Collins *et al.* (1998) y De León (1999) para la determinación de las q_{O_2} de la población formada por las células formadoras de progenitores (CFC^+) y la formada por las células no formadoras de progenitores (CFC^-). La ecuación establecida para este modelo bipoblacional es,

$$VCO = q_{O_2}^+ CFC^+ + q_{O_2}^- CFC^- \quad (6-1)$$

Donde $q_{O_2}^+$, es la velocidad específica de las colonias formadoras de progenitores y $q_{O_2}^-$, es la velocidad específica de las colonias no formadoras de progenitores. Los datos empleados para resolver la ecuación (6-1) incluyen los valores de VCO determinados *ex situ*, las concentraciones de progenitores obtenidas por los ensayos clonogénicos y la concentración de células MN (CFC^-) cuantificadas, para los cultivos en cajas petri. Con los datos mencionados se generó una matriz de 3x16, la que se resolvió por el método de mínimos cuadrados.

Al resolver la matriz, se obtuvo para la $q_{O_2}^-$ de las CFC^- un valor de 1.18×10^{-11} mmoles/cél/h y para la $q_{O_2}^+$ de las CFC^+ un valor de 4.53×10^{-10} mmoles/cél/h. El error estándar promedio calculado con respecto a los valores obtenidos a través de la ecuación (6-1), fue del 62%. El valor de $q_{O_2}^+$, fue muy similar al anteriormente reportado para los progenitores totales. En conclusión, además de la evidencia gráfica mostrada, los valores obtenidos con los modelos poblacionales evaluados indican de manera cuantitativa, que las células formadoras de colonias de progenitores poseen mayores q_{O_2} que las células no formadoras de colonias de progenitores.

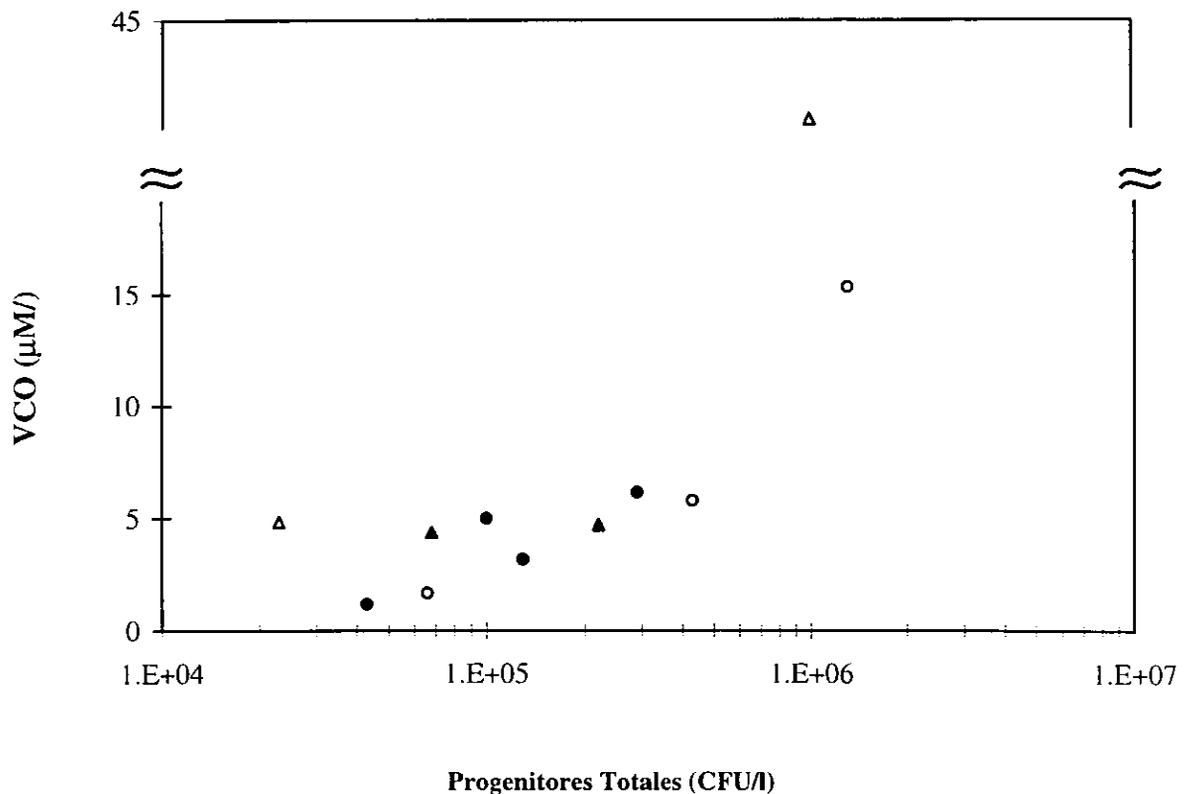


Figura 6-3. Variación de la VCO en función de la concentración de CFU progenitores totales. ○, △, ●, ▲ : cada símbolo representa a una muestra

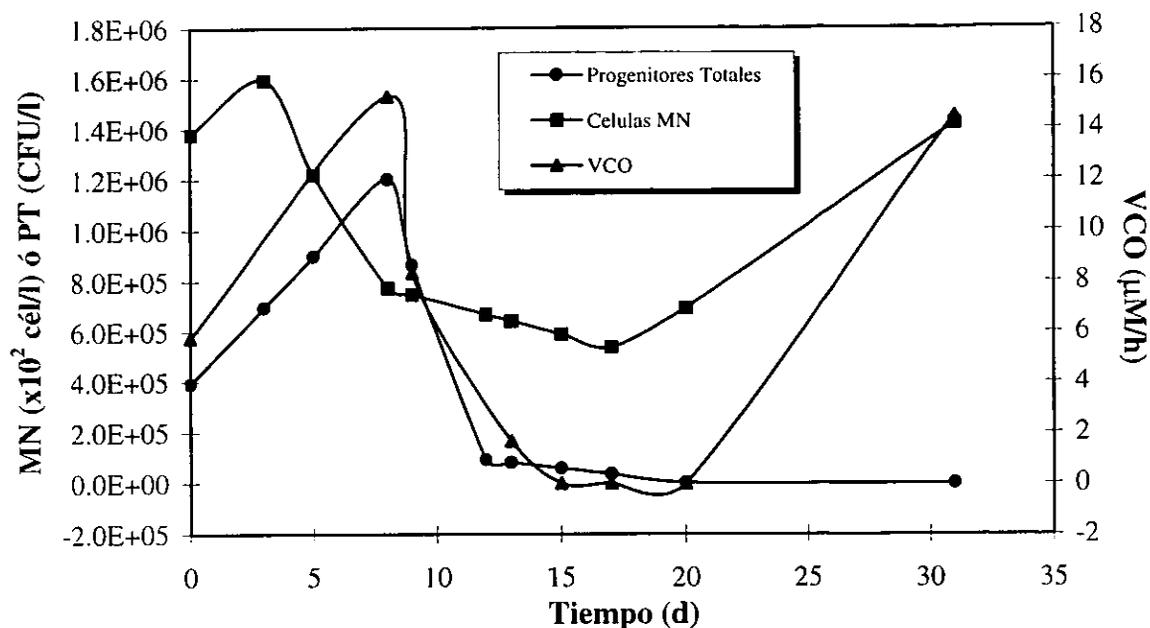


Figura 6-4. Variación típica de la concentración de células MN y la VCO con respecto al tiempo.

Adicionalmente, para conocer las q_{O_2} de los diferentes progenitores hematopoyéticos se estableció un modelo poblacional integrado por cuatro poblaciones celulares. Las poblaciones fueron determinadas de acuerdo con su estado de diferenciación en el proceso de la hematopoyesis (Figura 2-1) y estaban compuestas por: grupo 1, formado por la concentración de CFU-GEMM; grupo 2, formado por la sumatoria de las concentraciones de BFU-E y CFU-GM; grupo 3, formado por la sumatoria de las concentraciones de CFU-G, CFU-M y CFU-E y grupo 4, formado por la concentración de CFC⁻. El modelo de cuatro poblaciones se expresa de la siguiente manera,

$$VCO = q_{O_2,1}^+ CFC_1^+ + q_{O_2,2}^+ CFC_2^+ + q_{O_2,3}^+ CFC_3^+ + q_{O_2}^- CFC^- \quad (6-2)$$

Donde, los sub-índices 1, 2, 3 y 4, indican los grupos poblacionales 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Al resolver el sistema de ecuaciones planteado se obtuvieron las q_{O_2} para los cuatro grupos poblacionales propuestos. Los q_{O_2} obtenidos fueron: para el grupo 1 de 3.15×10^{-7} mmoles/cél/h,

para el grupo 2 de 4.90×10^{-10} mmoles/cél/h, para el grupo 3 de 8.24×10^{-9} mmoles/cél/h y para el grupo 4 de 6.22×10^{-12} mmoles/cél/h. Estos resultados son consistentes con lo expuesto y la evidencia experimental inicialmente mostrada en donde, las células formadoras de colonias de progenitores hematopoyéticos poseen una velocidad específica de consumo de oxígeno mayor que las células no formadoras de colonias de células progenitoras. Adicionalmente, se observa que los tipos celulares menos diferenciados poseen q_{O_2} mayores que las células más diferenciadas. Sin embargo, es importante resaltar que los valores de la q_{O_2} de las CFU-GEMM fueron muy altas y atípicas para células animales. Esto indica que para la realización de modelos multipoblacionales es necesario incluir información adicional a las q_{O_2} , o realizar un agrupamiento poblacional distinto que permita predecir correctamente la concentración de los diferentes progenitores hematopoyéticos en cualquier momento del cultivo. Adicionalmente, el resultado mencionado, también pudo generarse, porque en sistemas de ecuaciones lineales indeterminados es necesario el planteamiento de restricciones matemáticas que permitan la obtención de soluciones reales al fenómeno, las cuales, podrán establecerse correctamente, cuando se tenga un conocimiento profundo de los requerimientos metabólicos de los diferentes grupos poblacionales. Aunado a lo anterior, el error estándar promedio calculado con respecto a los valores obtenidos a través de la ecuación (6-2), fue del 37.8%. Este valor contrasta con el mayor valor del error estándar promedio determinado en el modelo de dos poblaciones. Esta discrepancia puede ser debida a que, en el sistema de ecuaciones lineales (15x2) obtenido a partir del modelo de dos poblaciones, la dispersión en la solución puede tender a ser más alta que en un sistema menos indeterminado, como fue caso del sistema de ecuaciones lineales (15x4) planteadas a partir del modelo de cinco poblaciones.

6.8 Cultivos estáticos

Se observó sustentación de la hematopoyesis en todos los sistemas de cultivo a pesar que no se realizó recambio de medio durante todo el cultivo, los cuales se mantuvieron en promedio, durante más de 25 días. La mayoría de las cinéticas de crecimiento de las células MN y de los progenitores totales siguieron la típica tendencia de crecimiento compuesta de sus diferentes fases de desarrollo, la de adaptación (o lag), la exponencial y la de muerte, exceptuando los cultivos realizados en cajas petri, donde no se detectó fase lag.

La figura (6-5) muestra las tendencias determinadas en los diferentes recipientes para células MN. Es importante resaltar que la máxima concentración de células MN se presentó a diferentes edades del cultivo entre los distintos recipientes empleados, del día 8 al 12 en placas multipozo, del día 10 al 19 en frasco T25 cm², en el día 7 en cajas petri^a y del día 1 al 3 en cajas petri^b. Adicionalmente, como se observa en la figura (6-5) y en la tabla (6-5) las proliferaciones máximas alcanzadas se obtuvieron en placas multipozo.

La figura (6-6) representa la tendencia de la expansión máxima promedio de los progenitores totales, determinada en placas multipozo y cajas petri. Se observa que la máxima expansión de los progenitores hematopoyéticos se presentó entre el día 3 al 8 para placas multipozo y cajas petri. Lo anterior, es muy diferente a lo determinado en cultivos a largo plazo tipo Dexter (LTC), donde la expansión de los progenitores hematopoyéticos se presenta en promedio a la quinta semana de cultivo. Esta diferencia está muy relacionada con la adición de citocinas recombinantes. Aunque en un tiempo mayor al indicado en el presente trabajo las máximas expansiones de progenitores hematopoyéticos en cultivos de MO realizados en bioreactores de perfusión se han detectaron entre el día 8 y 14 de cultivo (Koller *et al.*, 1993, Koller *et al.*, 1998a). Este tiempo reportado por los autores mencionados podría estar relacionado con el hecho que moléculas (necesarias para la expansión, diferenciación y proliferación) generadas en bajas concentraciones son diluidas de manera constante en cultivos en bioreactores de perfusión. La máxima concentración de progenitores hematopoyéticos en el día 7 de cultivo también se ha observado en cultivos de CH de SCUH en frascos agitados suplementados con citocinas recombinantes y con protocolos de remoción y reemplazo de medio de cultivo (Collins *et al.*, 1997). Lo que indica que mediante la adición de citocinas recombinantes se puede obtener la máxima concentración de progenitores hematopoyéticos en menor tiempo de cultivo con respecto a los sistemas de cultivo ya mencionados.

No existen muchos reportes en la literatura de cultivo en cajas petri a condiciones estáticas de CH de SCUH por largos periodos de tiempo (más de 7 días de cultivo). Sin embargo, de acuerdo con lo indicado en la figura (6-6) y en la tabla (6-5) la expansión de CFU-GM es aproximadamente 6.1 veces menor que la reportada por Broxmeyer *et al.* (1992) en un sistema de cultivo similar aunque suplementado con diferentes concentraciones de citocinas recombinantes y con un

inoculo 20 veces mayor al empleado en el presente trabajo. Lo anterior muestra la alta variabilidad que se puede alcanzar cuando se cambia tan solo una variable de cultivo en un sistema tan complejo como es el cultivo *in vitro* de CH de SCU. Las diferencias se acentúan cuando se comparan los resultados con los obtenidos en sistemas de cultivos con aplicación de protocolos de remoción y reemplazo de medio de cultivo. Es importante recordar que el empleo del sistema de cultivo en el presente trabajo, es un modelo de trabajo con el fin de conocer comportamientos y tendencias celulares y metabólicas anteriormente poco reportadas.

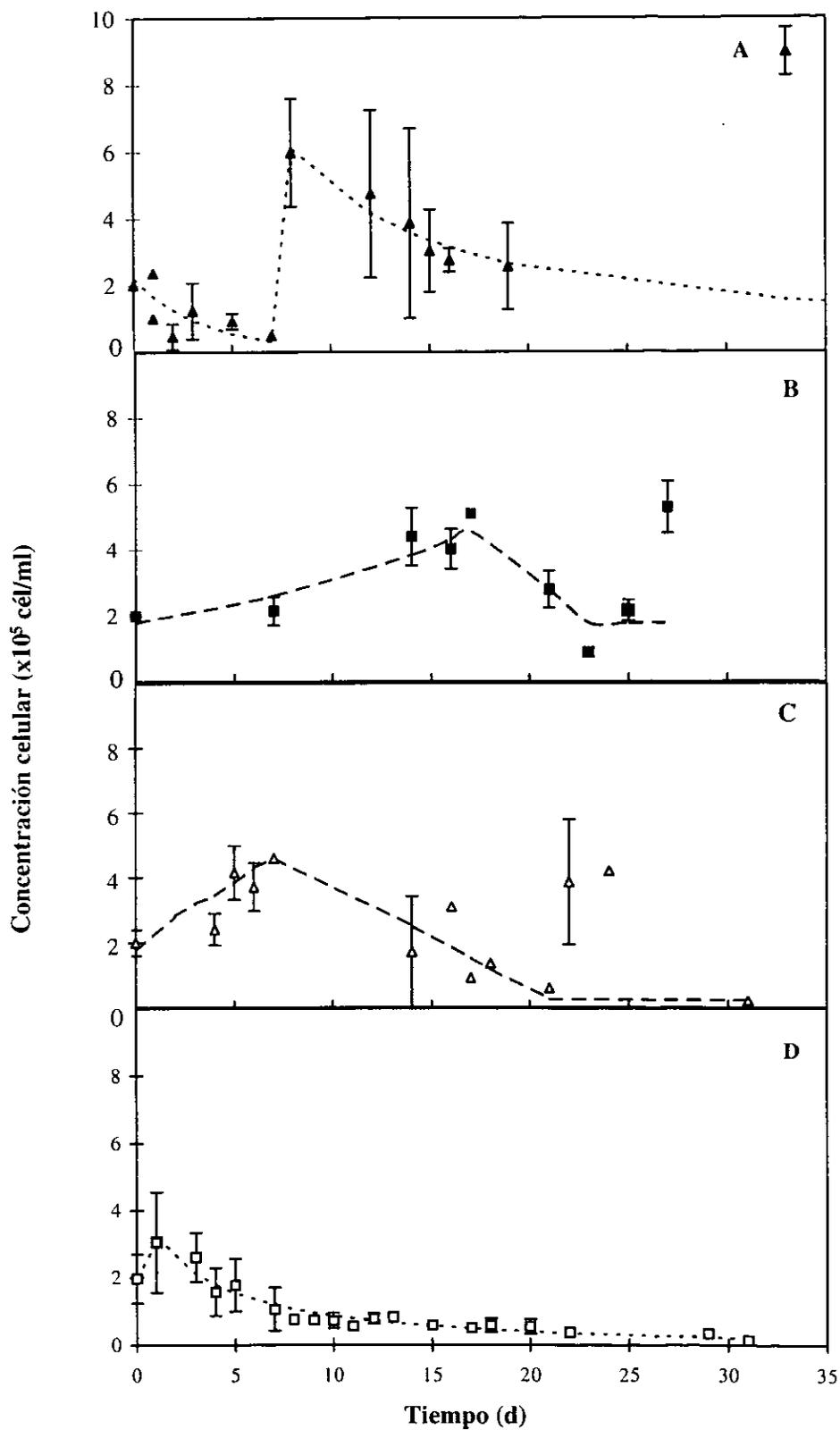


Figura 6-5. Cinéticas de crecimiento de células MN determinadas en los diferentes recipientes. A: P. multipozo. B: Frasco T 25 cm². C: Caja petri^a. D: Caja petri^b

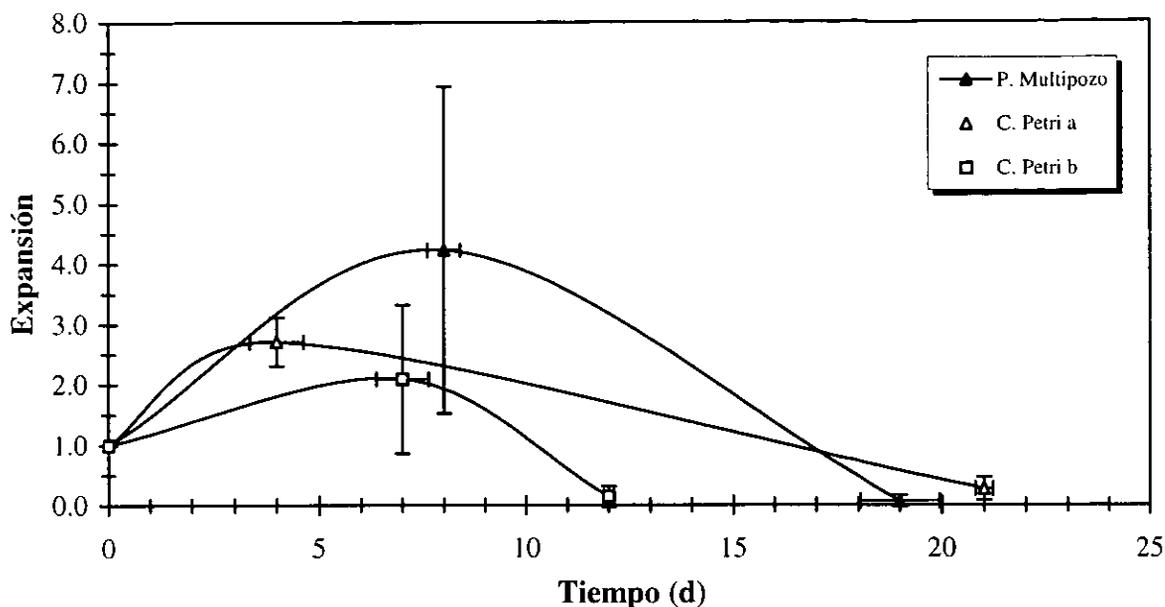


Figura 6-6. Esquema de la cinética de la expansión máxima promedio

Tabla 6-5. Valores máximos de diferentes parámetros obtenidos en los diversos recipientes para células MN y progenitores totales

Recipiente	Proliferación	Expansión PT	Expansión CFU-GM
Placa multipozo (n=6)	2.98±1.38	4.23±2.69	2.06±1.63
Caja petri ^a , (n=4)	2.08±0.31	2.71±0.78	1.36±0.45
Caja petri ^b , (n=3)	1.41±0.01	2.09±1.23	0.85±0.38
Frasco T 25 cm ² (n=2)	2.03±0.24	ND	ND

PT: Progenitores totales. ND: no determinado. ^a 4.0 ml de volumen. ^b 2.5 ml de volumen

Los resultados de expansión y proliferación obtenidos en los recipientes, permitieron establecer una relación decreciente entre la proliferación y el cociente entre el área del recipiente y el volumen de medio de cultivo y una relación igual, entre la expansión celular y el cociente mencionado. En los cultivos estáticos la transferencia de oxígeno es superficial y el área, es

determinante en este proceso. Como se observa en la figura (6-7), se presenta una mayor proliferación y expansión en los recipientes con el menor cociente, lo que indica que para esos recipientes pudo haber una concentración de oxígeno disuelto menor en la parte inferior del recipiente con respecto a los otros recipientes. Estos resultados están muy acordes con los planteamientos de diferentes autores, quienes plantean que los progenitores hematopoyéticos se expanden en mayor número a bajas concentraciones de oxígeno disuelto (Bradley *et al.*, 1978; Rich & Kubanek, 1982; Iahikawa & Ito, 1988; Koller *et al.*, 1992a y 1992b; Cipolleschi *et al.*, 1993; Ono & Anter, 1995).

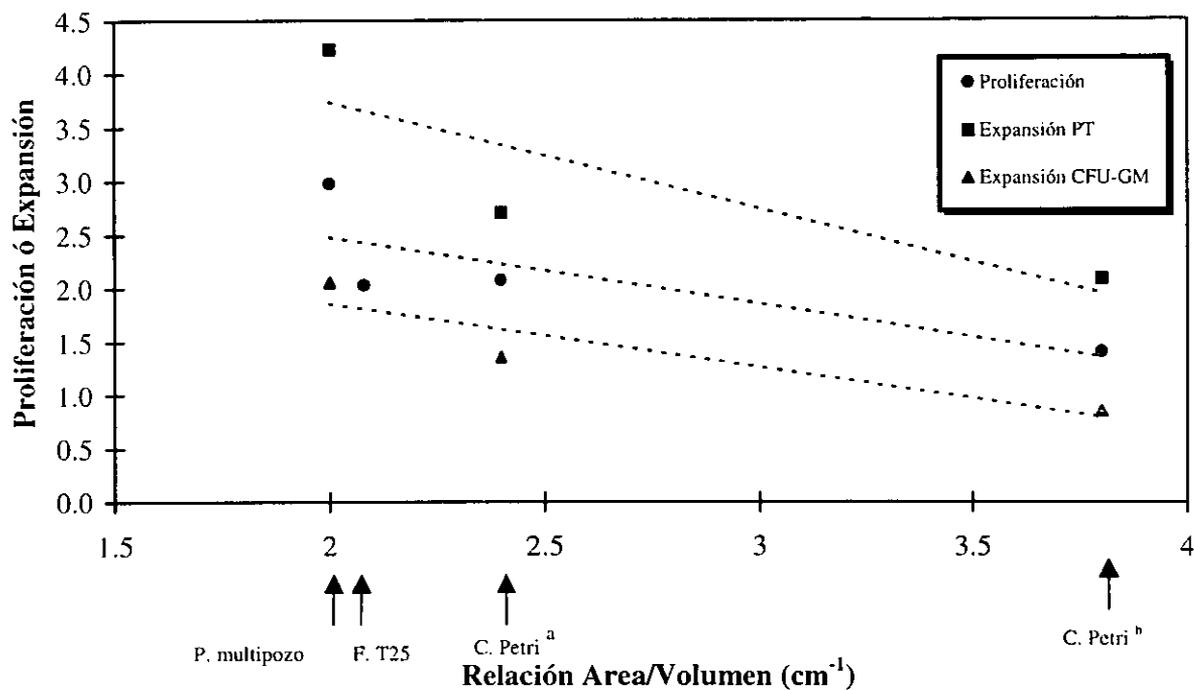


Figura 6-7. Relación de crecimiento entre la proliferación y expansión celular y el área de cultivo. Determinada en los distintos recipientes de cultivo

La velocidad específica de crecimiento (μ) determinada para los cultivos realizados en distintos recipientes se reúnen en la tabla (6-6). La variabilidad de la μ determinada para las células MN puede ser debida a la variabilidad intrínseca de cada muestra, aunque es importante resaltar que los intervalos de variación fueron muy similares en todos los recipientes. Adicionalmente, el límite inferior de estos es 10 veces menor a la μ reportada por De León (1999), López (1999) y

Zandstra (1994) sin embargo, el límite superior es similar a los valores reportados por los autores mencionados.

La μ calculada para los progenitores totales, de la cual no existen reportes, mostró un valor de 2 a 5 veces mayor que la calculada para las células no adherentes totales. Esto es otra indicación de la mayor capacidad proliferativa de los progenitores hematopoyéticos que otras formas celulares que componen el proceso hematopoyético, como son las células MN no progenitoras.

Tabla 6-6. Velocidad específica de crecimiento determinada para células MN y para progenitores totales en los distintos recipientes

<i>Recipiente</i>	$\mu (d^{-1})$ Células MN	$\mu (d^{-1})$ Progenitores Totales
Placa multipozo (n=6)	0.021 a 0.128	0.175 a 0.595
Caja petri ^a (n=4)	0.076 a 0.158	ND
Caja petri ^b (n=3)	0.039 a 0.107	0.201 a 0.259

6.9 Células Adherentes

La concentración de células adherentes presentó mucha variabilidad entre los diferentes cultivos, posiblemente a la variabilidad debido entre las muestras. La concentración máxima se presentó en los cultivos en cajas petri a la tercera semana de cultivo (Figura 6-8). De igual manera, Gutiérrez *et al.* (2000) obtuvieron la máxima concentración en la tercera semana de cultivo en placas multipozo, y fue 3.7 veces menor que la obtenida en el presente trabajo. Esta diferencia en las concentraciones obtenidas, podría estar relacionada con el protocolo de recambio de medio empleado por Gutiérrez *et al.* (2000), el cual, estaría afectando la estructura celular formada en el recipiente entre los procedimientos de recambio (Varma *et al.*, 1992).

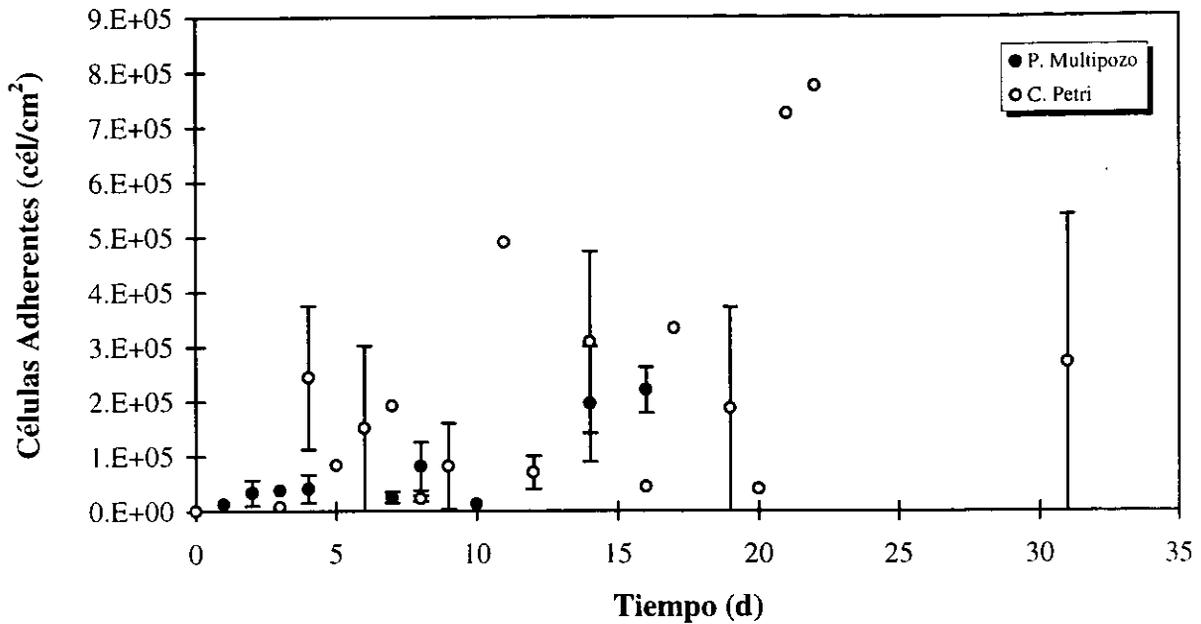


Figura 6-8. Cinética promedio de las células adherentes presentes en los cultivos en placas multipozo y cajas petri.

Como se aprecia en la figura (6-8), las concentraciones determinadas en placas multipozo fueron menores a las detectadas en cajas petri lo que podría estar principalmente relacionado con la diferente metodología de extracción de células adherentes empleada en los dos recipientes de cultivo mencionados. La posibilidad de variaciones en la adherencia causada por las diferentes características de la superficie de cultivo queda excluida ya que las superficies de adhesión tanto de las placas multipozo como de las cajas petri fueron tratadas de igual forma por sus fabricantes. (Ye *et al.*, 1994; Koller *et al.*, 1998b).

6.10 Caracterización metabólica (glucosa, glutamina, lactato y glutamato)

Las concentraciones de los sustratos remanentes o de los productos generados a lo largo del cultivo fueron analizados en los cultivos en distintos recipientes. Las figuras (6-9) reúnen las concentraciones promedios de los sustratos en cada uno de los recipientes, de tal manera que cada punto representa el promedio de los valores registrados en los cultivos realizados en cada recipiente de cultivo según la tabla (5-1). De igual manera se elaboró la figura (6-10). Adicionalmente, las velocidades de consumo y de producción específica de los sustratos y

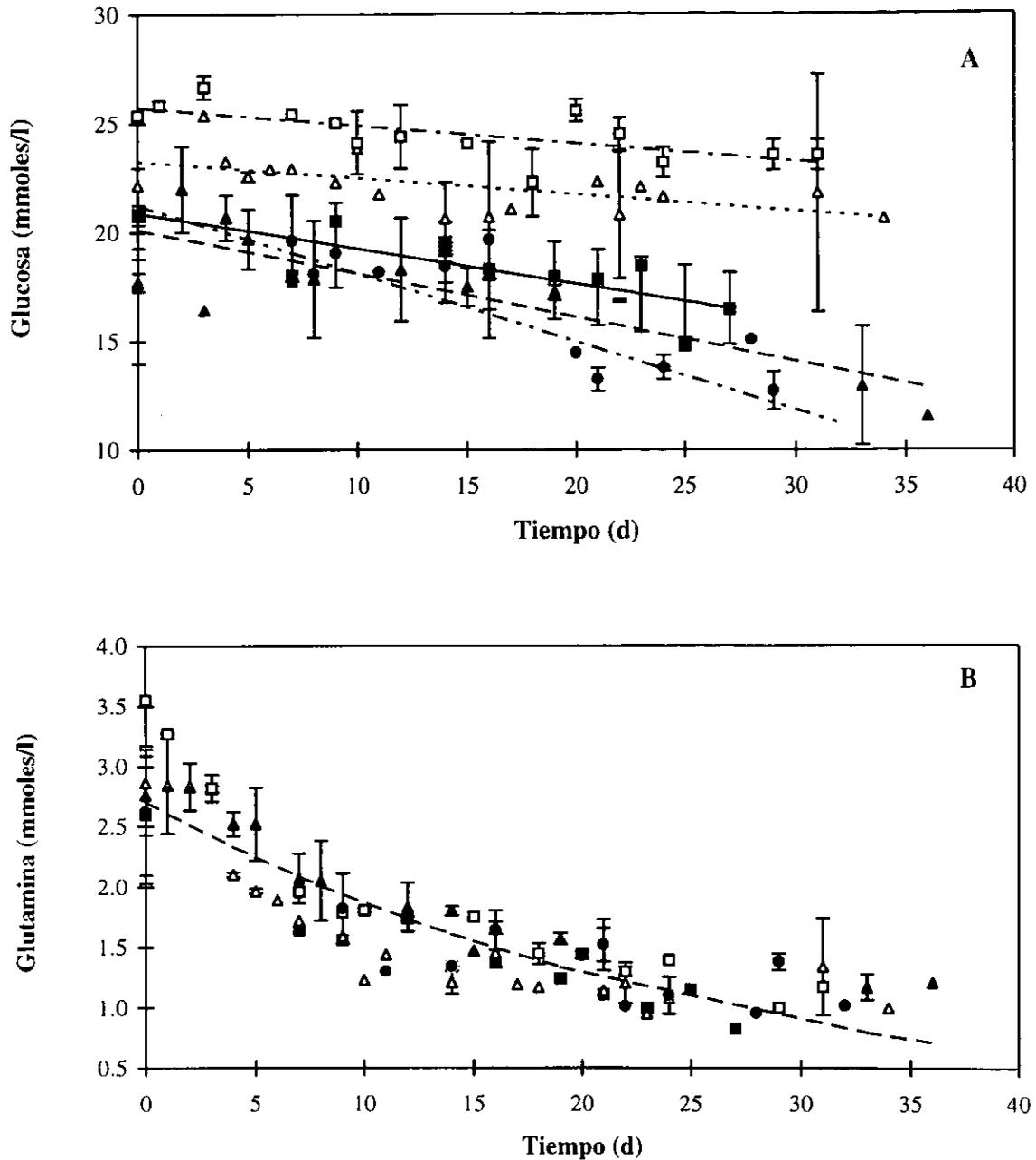


Figura 6-9. Cinéticas promedio del consumo de metabolitos en los diferentes recipientes. A. Glucosa, B. Glutamina. Los datos sin barras de error son datos de una sola muestra. Las líneas punteadas indican la ecuación que se ajusta a cada tendencia (Ver Apéndice B).

- ▲ P. multipozo
- Frasco T 25 cm2
- △ C. petri a
- - - C. petri b
- - - P. multipozo
- Frasco T 75 cm2
- C. petri a
- Frasco T 25 cm2
- - - Frasco T 75 cm2
- C. petri b

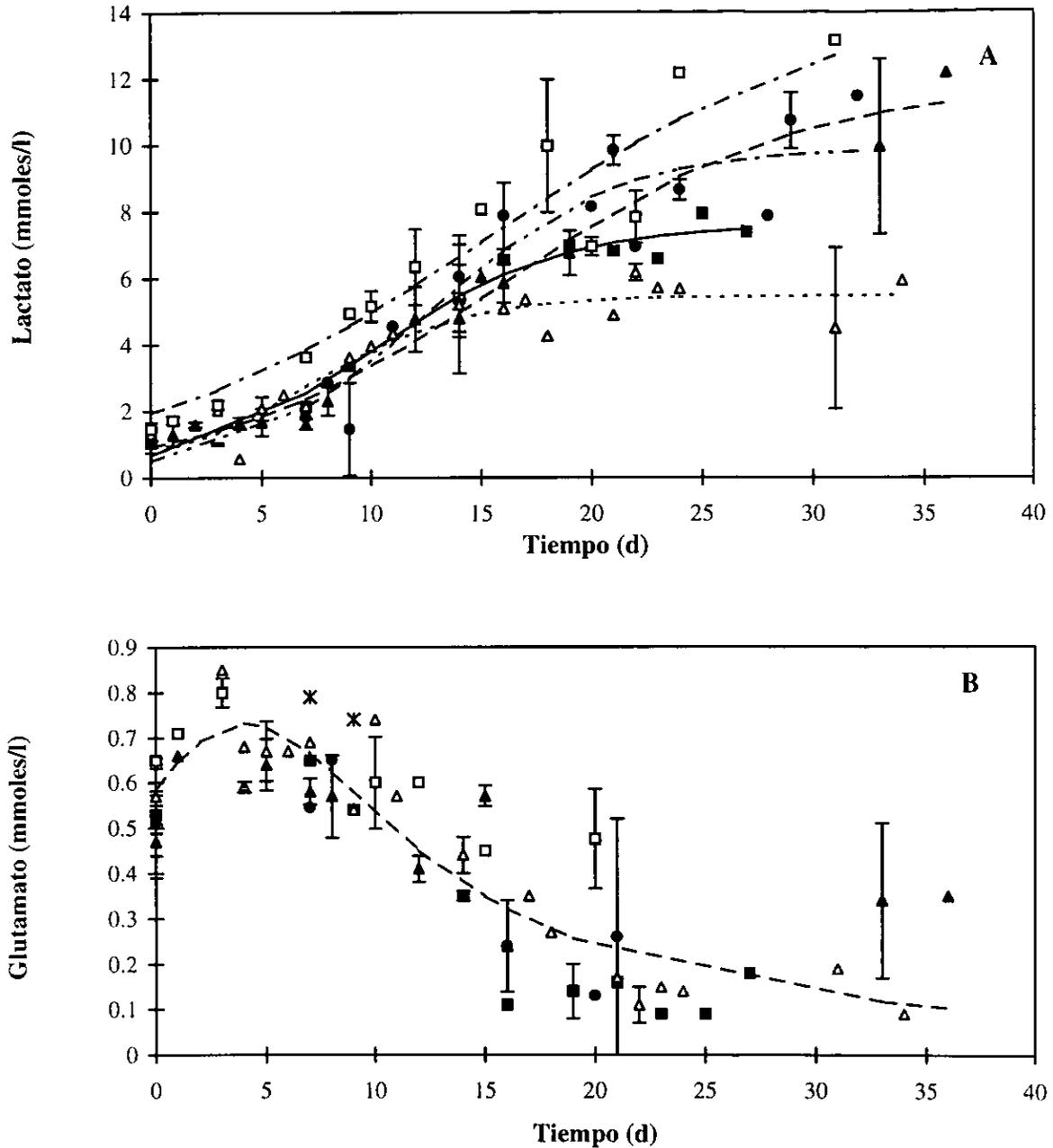


Figura 6-10. Cinéticas promedio de la producción de metabolitos en los diferentes recipientes. A. Lactato. B. Glutamato. Los datos sin barras de error son datos de una sola muestra. Las líneas punteadas indican la ecuación que se ajusta a cada tendencia (Ver Apéndice B)

metabolitos respectivamente, calculadas durante la fase exponencial de la cinética de crecimiento de los progenitores totales, se reúnen en la tabla (6-7).

Tabla 6-7. Intervalos (mínimos y máximos) de las velocidades específicas de consumo/producción de los diferentes sustratos/metabolitos. Las velocidades específicas de consumo o producción se encuentran expresadas en mmoles/cél/h y fueron calculadas en la fase exponencial de los progenitores totales

Sustrato/Metabolito	<i>P. multipozo</i>	Caja petri ^a	Caja petri ^b	Frasco T 25 cm ²
<i>Glucosa</i>	1.1 x 10 ⁻¹⁰	2.1 x 10 ⁻¹¹	2.0 x 10 ⁻¹¹	3.2 x 10 ⁻¹¹
	5.3 x 10 ⁻¹⁰	6.9 x 10 ⁻¹¹	7.7 x 10 ⁻¹¹	6.0 x 10 ⁻¹¹
<i>Glutamina</i>	9.4 x 10 ⁻¹¹	1.6 x 10 ⁻¹¹	1.6 x 10 ⁻¹¹	ND
	3.0 x 10 ⁻¹⁰	1.8 x 10 ⁻¹⁰	1.8 x 10 ⁻¹⁰	
<i>Lactato</i>	2.0 x 10 ⁻¹¹	4.4 x 10 ⁻¹⁰	7.0 x 10 ⁻¹¹	5.0 x 10 ⁻¹¹
	1.2 x 10 ⁻¹⁰	1.8 x 10 ⁻⁹	4.3 x 10 ⁻¹⁰	1.1 x 10 ⁻¹⁰
<i>Glutamato</i>	Producción	Producción	Producción	ND
	2.3 x 10 ⁻¹¹	1.0 x 10 ⁻¹²	2.2 x 10 ⁻¹²	
	1.8 x 10 ⁻¹⁰	1.0 x 10 ⁻¹¹	1.3 x 10 ⁻¹¹	
	Consumo	Consumo	Consumo	
	5.9 x 10 ⁻¹¹	1.1 x 10 ⁻¹²	1.2 x 10 ⁻¹²	
	1.5 x 10 ⁻¹⁰	1.1 x 10 ⁻¹¹	1.3 x 10 ⁻¹¹	

El intervalo de las velocidades de consumo específico de glucosa presentado en todos los recipientes fue de 2.8×10^{-11} a 5.3×10^{-10} mmoles/cél/h, el cual fue muy similar al intervalo de los consumos específicos de glutamina en los diferentes recipientes de cultivo que varió entre 6.4×10^{-11} y 3.0×10^{-10} mmoles/cél/h. Lo anterior indica la utilización de ambos sustratos por las células en cultivo. Adicionalmente, la figura (6-9) muestra que no se agotó ninguno de los dos sustratos en los cultivos realizados.

En la tabla (6-7) se observa que los q_{Glc} son 3 a 5 veces mayores que los expuestos por López (1999) en cultivos realizados en placas multipozo con citocinas recombinantes y, son 10 veces mayores que los reportados por Collins *et al.* (1997) y Patel *et al.*, (2000). Posiblemente las distintas concentraciones de citocinas entre los mencionados trabajos estimuló de manera diferente el q_{Glc} , que como se ha reportado anteriormente, varía por estímulos externos como son los factores de crecimiento (Spielholz *et al.*, 1995).

Sin embargo, la mayor q_{Glc} ocurrió en los cultivos realizados en placas multipozo lo cual puede ser debido a la mayor expansión obtenida en este recipiente, indicando que los progenitores totales poseen q_{Glc} mayores que otros tipos celulares. Este resultado coincide con lo reportado por Collins *et al.* (1998), quienes encontraron que a mayor concentración de CFC^+ (colonias formadoras de colonias de progenitores) se detectó la mayor q_{Glc} .

De acuerdo con la figura (6-9b) los datos se ajustan a un modelo exponencial con formula:

$$[Gln] = [Gln]_0 \exp(kt) \quad (6-1)$$

Donde $[Gln]$ es la concentración de glutamina en un tiempo determinado, $[Gln]_0$ es la concentración inicial de glutamina, k es la constante de degradación y consumo y t , es el tiempo. Este modelo es muy similar al reportado por Ozturk & Palsson (1990) para la descomposición de la glutamina. De acuerdo con ellos, el coeficiente k de degradación química de la glutamina en las condiciones de cultivo empleadas posee un valor de 0.05 d^{-1} , mientras que la k obtenida en éste trabajo de la curva promedio construida a partir de las concentraciones remanentes de glutamina en los diferentes recipientes y cultivos fue de 0.82 d^{-1} . Lo anterior indica que la diferencia entre las dos curvas formadas con los exponentes k indicados, representa el verdadero consumo realizado por las células.

Adicionalmente, el parámetro α calculado varió entre 0.05 y 0.5, el β entre 0.8 a 1.1 y el γ entre 0.7 a 0.9. Mientras que, los parámetros calculados por Ozturk & Palsson (1990) para cultivo de hibridomas variaron de 0.02 a 0.2 (para α), β , 46 (para β), y de 0.2 a 0.5 (para γ), respectivamente. Aunque se observa cierta similitud entre los diferentes parámetros a pesar de ser modelos biológicos distintos, es notoria la gran diferencia encontrada en el parámetro β . Esta diferencia se debe posiblemente a los diversos valores de los parámetros que conforman el cálculo de β . Desgraciadamente, solo existe en la literatura un reporte de los parámetros adimensionales anteriores y, el presente trabajo es el primer reporte de estos parámetros para células hematopoyéticas. Sería interesante analizar en posteriores trabajos como varían estos parámetros en diferentes condiciones de cultivo.

El intervalo de q_{Gln} fue muy similar en los cultivos realizados en placas multipozo y cajas petri. A pesar que no se realizaron experimentos con marcaje de carbono para determinar la ruta metabólica de los diferentes sustratos, los resultados anteriores permiten suponer que las CH de SCUH cultivadas en este proyecto, utilizaron de manera simultánea la glicólisis y la glutaminólisis.

El intervalo de q_{Lac} fue muy similar en todos los recipientes y a valores anteriormente reportados por Patel *et al.* (2000) para cultivos no alimentados y, por Collins *et al.* (1997) para cultivos en frascos agitados. Sin embargo, el intervalo de q_{Lac} obtenido en cajas petri^a fue 10 veces mayor (Tabla 6.7). Este resultado posiblemente se debió a carencias de oxígeno que se presentaron en este recipiente, por tener una mayor altura de medio, en comparación con todos los demás (Figura 6-10a).

6.11 Relación creciente entre la concentración de glutamato y los progenitores totales

Se obtuvo una tendencia reproducible de la cinética de glutamato en cultivos lote a condiciones estáticas de las CH de SCUH. En los primeros días del cultivo en todos los recipientes, se presentó una producción de glutamato a una velocidad específica de producción en el intervalo de 9.2×10^{-13} a 1.8×10^{-10} mmoles/cél/h. Sin embargo, el glutamato producido en los primeros días de cultivo fue disminuyendo en los siguientes días, a pesar de no haberse agotado ni la glucosa ni la glutamina, en un intervalo de velocidad de desaparición (7.0×10^{-13} a 1.3×10^{-11} mmoles/cél/h) muy similar al intervalo de las velocidades de producción de este metabolito en los primeros días de cultivo. Este comportamiento de producción y de disminución de la concentración de glutamato fue también reportado por López (1999) en dos muestras.

Se calcularon los valores verdaderos de glutamato producido, al restar la concentración inicial de glutamato en el medio a cada valor de glutamato, determinado durante el tiempo de producción de éste. A estos valores se les denominará en adelante, glutamato real producido. Se encontró una relación creciente entre el glutamato real producido y la concentración de progenitores totales, cuando ésta concentración variaba de 1×10^5 a 14×10^5 células/l, y el glutamato real producido variaba entre 0 y 0.30 mmoles/l (Figura 6-11). De acuerdo con éste resultado, se plantea en el

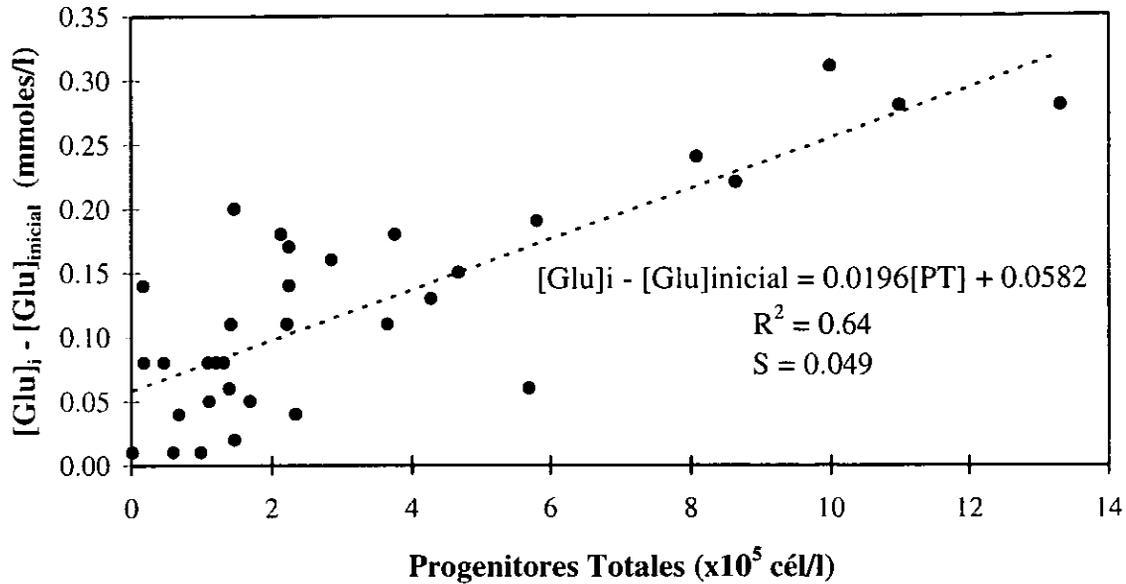


Figura 6-11. Relación creciente entre la diferencia de la concentración de glutamato en un tiempo *i* y la concentración inicial de glutamato y la concentración de progenitores totales

presente proyecto, que los progenitores hematopoyéticos consumen glutamina y generan glutamato. Debido a esto, se observa la relación creciente mencionada, donde el glutamato real producido aumenta a medida que aumenta la concentración de progenitores totales, que consumen glutamina y generan glutamato. Este resultado indica, que la determinación del glutamato en los cultivos *in vitro* de CH de SCUH podría ser una herramienta potencial para inferir la mayor concentración de progenitores totales, de manera rápida (en menos de 2 minutos) y con poco volumen de medio de cultivo (25 μ l).

Sin embargo, no se observó una tendencia similar entre la concentración de glutamato y los progenitores totales, durante la fase de disminución del glutamato. Esto podría estar ligado a los resultados obtenidos por Kostanyan *et al.* (1998). Estos autores reportaron que el ácido L-glutámico cuando se encuentra a una concentración de 0.1 μ M en el medio de cultivo de células HL-60 incrementa la afinidad de unión del TNF- α y disminuye la sensibilidad de las células mencionadas a la IL-1 β e IL-6 (Kostanyan *et al.*, 1998). Como se conoce, las interleucinas 1 y 6 ejercen un efecto directo sobre las CT hematopoyéticas y actúan de manera sinérgica con

muchos factores para aumentar la proliferación de CFC⁺, blastos y células del linaje mieloide (Beutler *et al.*, 1995). Aunque la concentración reportada por Kostanyan *et al.* (1998) es mucho menor a la observada en el presente estudio (0.7 mM) permite suponer que, cuando el glutamato se acumula a una concentración de 0.7 mM en cultivos estáticos de CH de SCUH, podría afectar la expansión de progenitores totales. Esta característica del glutamato para inducir funciones específicas cuando alcanza ciertas concentraciones ha sido reportada. Por ejemplo, cuando la concentración del glutamato varía entre 60 a 80 μ M induce el consumo de glucosa por los astrocitos y las neuronas (Zigmond *et al.*, 1999).

Adicionalmente, la disminución de la concentración de glutamato observada en la figura (6-10b), podría ser causada por la remoción del glutamato del medio cuando alcanza una concentración de 0.75 mM, o como se plantea en éste estudio, por el consumo o remoción del glutamato por poblaciones celulares post-progenitoras. La remoción del glutamato del medio extracelular es un proceso normal que ocurre en el SNC, específicamente en sinapsis excitables, para prevenir la sobreactivación de los receptores de glutamato, lo cual podría generar daño neuronal de tipo excito-tóxico. Quizás el mecanismo mencionado esté presente en las CH. La suposición del presente proyecto sobre el posible consumo o remoción del glutamato por poblaciones celulares post-progenitoras, se basa en los resultados de dos cultivos. En uno de los cultivos realizados, no se observó crecimiento de ningún tipo de células desde los primeros días de cultivo y el glutamato generado se acumuló a lo largo de todo el cultivo y no disminuyó (Figura 6-12). En cambio en el otro cultivo, aunque no se observó crecimiento de células MN, si se detectó crecimiento de progenitores totales. Además, se observó disminución de la concentración de glutamato días después de la expansión máxima de los progenitores totales y en ausencia de éstas poblaciones celulares, cuando se inició el consumo de glutamato (Figura 6-13). Las observaciones mencionadas, hacen suponer que poblaciones celulares post-progenitoras no determinadas, son responsables de la desaparición del glutamato.

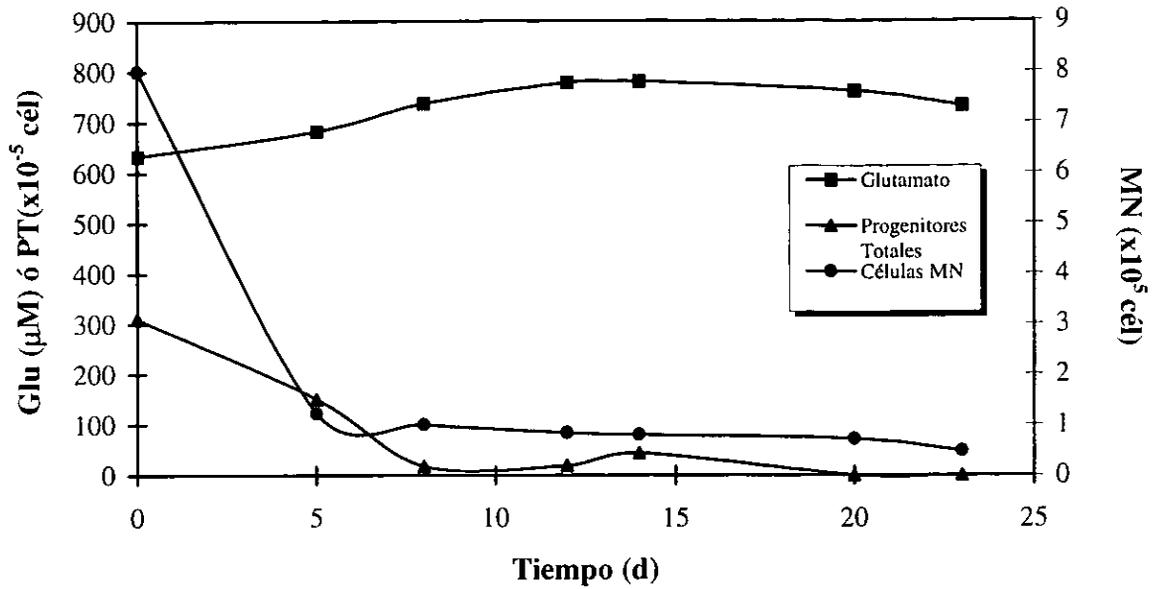


Figura 6-12. Cinética de una muestra que no presentó crecimiento de células MN ni de progenitores totales. PT: Progenitores totales, Glu: Glutamato

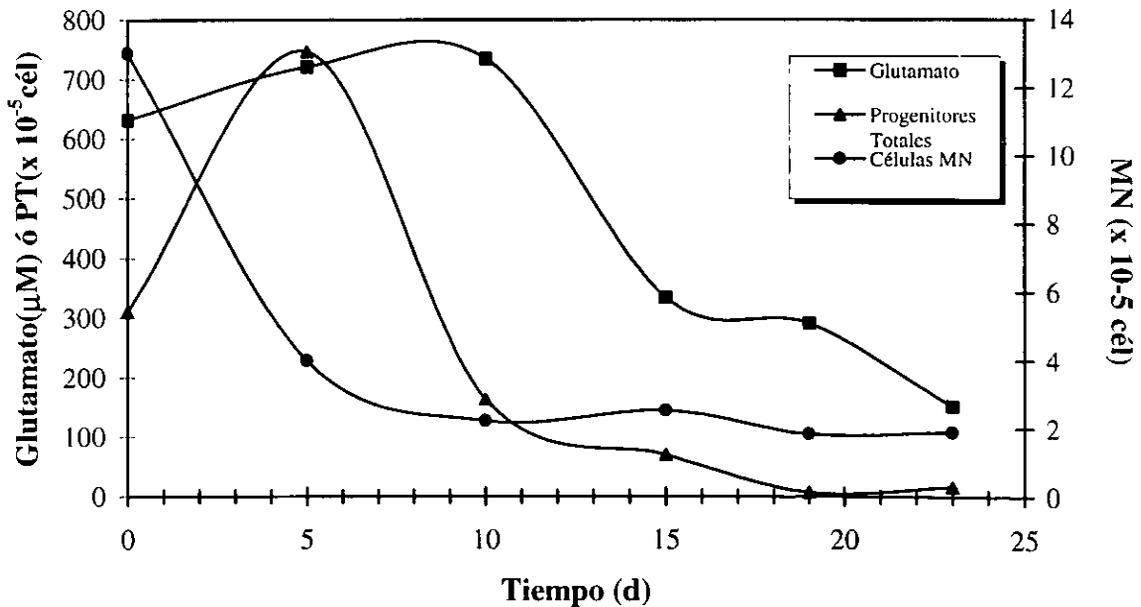


Figura 6-13. Cinética de una muestra que no presentó crecimiento de células MN, pero sí mostró crecimiento de progenitores totales

7 CONCLUSIONES

En éste estudio se determinó la existencia de concentraciones de progenitores hematopoyéticos típicos en sangre de cordón umbilical de neonatos mexicanos, de madres que asisten al centro de salud empleado, bajo el protocolo de recolección y de ensayo clonogénico utilizado. Estas concentraciones típicas brindan información valiosa, para que a partir de estos valores se planteen estrategias de recolección que permitan aumentar las concentraciones de progenitores hematopoyéticos en la sangre recolectada.

Adicionalmente, la sustentación de la hematopoyesis en un sistema de cultivo sin recambio de medio, es una prueba más de la posibilidad de realizar cultivos en lote. Aunque es necesario la experimentación para la implantación de diferentes estrategias de cultivo (agitación, otra combinación de citocinas) que permitan alcanzar mayores expansiones celulares.

En éste proyecto se diseñó un dispositivo y se estableció la metodología para la medición *ex situ* de la VCO de CH de SCUH. La velocidad específica de consumo de oxígeno determinada para las células no adherentes en el dispositivo mencionado, varió en un intervalo de 3.17×10^{-11} a 1.13×10^{-10} mmoles/cel/h. El conocimiento de estos valores permitirá un diseño apropiado de los sistemas de cultivo que satisfagan las necesidades de oxígeno para las CH de SCUH. Además, éste dispositivo permitirá evaluar el comportamiento de las CH de SCUH en cultivo *in vitro* en diversas condiciones, con un parámetro tan importante como es la VCO. Entre las ventajas del dispositivo se encuentran, la posibilidad de realizar mediciones en tiempo corto sin perturbar el sistema de cultivo y emplear pequeñas cantidades de medio de cultivo y citocinas. Aunado a lo anterior y ante lo dispendioso y lento de la determinación convencional de los progenitores hematopoyéticos, la relación creciente determinada entre la concentración de progenitores totales y la VCO es una herramienta potencial para determinar el momento de cosecha de la mayor concentración de progenitores hematopoyéticos durante su cultivo *in vitro*. A pesar que un cultivo de CH de SCUH está compuesto por numerosas poblaciones de células de diferente tipo, con estados de diferenciación y comportamientos metabólicos diversos, se encontró que los progenitores hematopoyéticos presentan mayor VCO, que formas celulares más diferenciadas

Esto fue corroborado con el un modelo bipoblacional con el cual, se obtuvieron valores de la q_{O_2} para CFC⁺ y CFC⁻ de 4.53×10^{-10} y 1.18×10^{-11} mmoles/cél/h, respectivamente. No obstante, al aplicar un modelo de cuatro poblaciones se obtuvieron valores de la q_{O_2} muy altos para algunas de las poblaciones. Posiblemente para utilizar modelos multipoblacionales es necesario incluir información adicional al modelo.

Se observó una relación entre el cociente área/volumen y la proliferación y expansión máximas de CH de SCUH en cultivos a condiciones estáticas. Estos resultados podrían dar pautas interesantes para el diseño de sistemas más eficientes de expansión.

Adicionalmente, se encontró que las máximas concentraciones de progenitores totales se presentaron entre el tercer y octavo día en cultivos en placa multipozo y cajas petri. El establecimiento de este intervalo permitirá el planteamiento de experimentos dirigidos y enfocados a ahondar en el conocimiento del comportamiento metabólico y poblacional de los cultivos de CH de SCUH, en un intervalo de tiempo más pequeño, y no como en los 25 o 30 días como hasta ahora se han realizado.

Anteriormente, no se había reportado de manera importante y reproducible, la tendencia de producción y consumo del glutamato en cultivos *in vitro* de CH de SCUH. La relación entre la producción de glutamato y los progenitores totales, podría convertirse en una herramienta más para inferir la máxima concentración de progenitores totales y para decidir la edad del cultivo para cosechar las células. Es importante resaltar que la determinación del glutamato es una prueba rápida, en menos de cinco minutos, y con consumo de muy poco medio de cultivo, 25 μ l.

La relación creciente entre la diferencia de la concentración de glutamato a un tiempo dado y la concentración inicial de glutamato, con la concentración de progenitores totales, coloca al glutamato como una herramienta potencial para la detección rápida de la mayor concentración de progenitores hematopoyéticos, en la fase exponencial del cultivo. Para corroborar éste planteamiento, es necesario determinar si son los progenitores hematopoyéticos los que consumen glutamina y generan glutamato. De igual manera, es importante determinar si formas.

post-progenitoras consumen glutamato o existe un mecanismo de remoción del glutamato del medio de cultivo, el que ocasiona la disminución o desaparición del glutamato.

8 REFERENCIAS

- Abboud, C. & Lichtman, M. 1995. Structure of the marrow. En: Williams Hematology. E. Beutler, M. Lichtman, B. Coller, T. Kipps (eds.). Fifth Edition. McGraw-Hill. New York. USA
- Aguila, A., Valentinotti, S., Galindo, E. & Ramírez, O. 1993. Desarrollo de un sistema amigable y versátil para la adquisición y control de biorreactores. **Biotecnología**. 3:130-139
- Ardawi, M. & Newsholme, E. 1983. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochem. J.** 212:835-842
- Atkinson, B. & Mavituna, F. 1993. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. McMillan. London
- Barnabé, N. & Butler, M. 2000. The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma. **Cytothechnol.** 34:47-57
- Belvedere, O., Feruglio, C., Malangone, W., Bonora, M., Minisini, A., Spizzo, R., Donini, A., Sala, P., De Anna, D., Hilbert, D.M. & Degrassi, A. 2000. Increased blood volume and CD34⁺CD38⁻ progenitor cell recovery using a novel umbilical cord blood collection system. **Stem Cells**. 18: 245 – 251
- Bird, R., Clements, J. & Becker, I. 1951. The metabolism of leukocytes taken from peripheral blood of leukemic patients. **Cancer**. 1009-1014
- Bradley, T., Hodgson, G. & Rosendaal, M. 1978. The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation *in vitro*. **J. Cell. Physiol.** 97:517-522
- Brandt, J., Briddell, R., Srour, E., Leemhius, T. & Hoffman, R. 1992. Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. **Blood**. 79:634-341
- Breems, D., Blokland, E., Siebel, K., Mayen, A., Engels, L. & Ploemacher, R. 1998. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during *ex vivo* expansion of CD34⁺ mobilized peripheral blood stem cells. **Blood**. 91:111-117
- Broxmeyer, H. 1998. Introduction: the past, present, and future of cord blood transplantation. En: Cellular characteristics of cord blood and cord blood transplantation. H.E. Broxmeyer (ed.). First edition. AABB Press. Maryland. USA
- Broxmeyer, H., Douglas, G., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L. & Boyse, E. 1989. Human umbilical cord umbilical cord blood as potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 86 : 3828 – 3832

- Broxmeyer, H., Hangoc, G., Cooper, S., Ribeiro, R., Graves, V., Yoder, N., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L. & Rubinstein, P. 1992. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89:4109-4113
- Butler, M. 1990. The characteristics and growth of cultured cells. En: Mammalian cell biotechnology. M. Butler (ed). First edition. Oxford University Press. New York. USA
- Butler, M. & Jenkins, H. 1989. Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. **J. Biotechnol.** 12:97-110
- Charlton, B., Auchincloss, H. & Fathman, G. 1994. Mechanisms of transplantation tolerance. **Annu. Rev. Immunol.** 12:707-734
- Chenu, C., Serre, C., Raynal, C., Burt-Pichat, B. & Delmas, P. 1998. Glutamate receptors are expressed by bone cells and are involved in bone resorption. **Bone.** 22:295-299
- Cipolleschi, M., Sbarba, P. & Olivotto, M. 1993. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. **Blood.** 87:2031-2037
- Collins, P., Nielsen, L., Patel, S., Papoutsakis, T. & Miller, W. 1998a. Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system. **Biotechnol. Prog.** 14:466-472
- Collins, P., Miller, W. & Papoutsakis, E. 1998b. Stirred culture of peripheral and cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinical relevant applications. **Biotechnol. Bioeng.** 59:534-543
- Collins, P., Nielsen, L., Wong, C., Papoutsakis, T. & Miller, W. 1997. Real-time method for determining the colony-forming cell content of human hematopoietic cell cultures. **Biotechnol. Bioeng.** 55:693-700
- Crawford, J. & Cohen, H. 1985. The essential role of L-glutamine in lymphocyte differentiation *in vitro*. **J. Cell. Physiol.** 124:275-282
- De León, A. 1999. Expansión de células hematopoyéticas humanas suspendidas en reactores instrumentados: utilidad de la velocidad de consumo de oxígeno y el potencial redox. **Tesis de Doctorado en Biotecnología.** Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- De León, A., Mayani, H. & Ramírez, O. 1999. Design, characterization, and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions. **Cytotechnol.** 28:127-138
- Dexter, T., Allen, T. & Lajtha, L. 1977. Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cells *in vitro*. **J. Cell. Physiol.** 91:335-344

- Diessel van, J., Olievier, K., Leijh, P. & Furth van, R. 1986. A reaction vessel for the measurement of oxygen consumption by small numbers of cells in suspension. **J. Immunol. Methods.** 92:271-280
- Donaldson, C., Armitage, W. & Buchanan, R. 1999. Obstetric factors influencing cord blood collections. **Blood.** 8: 92 – 121
- Doran, P. 1999. Mass transfer. En: Bioprocess Engineering Principles. Fourth Edition. Academic Press. San Diego. USA
- Eaves, C. & Lambie, K. 1995. Atlas of human hematopoietic colonies. **Stem Cell Technologies Inc.** 1-41
- Eaves, C., Cashman, J. & Eaves, A. 1991. Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells. **J. Tiss. Cult. Meth.** 13:55-62
- Eyer, K., Oeggerli, A. & Heinzle, E. 1995. On-line gas analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine. **Biotechnol. Bioeng.** 45:54-62
- Ferrara J. & Deeg, H. 1991. Graft-versus-host disease. **N. Engl. J. Med.** 324:667-674
- Fiorentino, D., Zlotnik, A., Mosmann, T., Howard, M. & O'Garra, A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.** 147:3815-3822
- Fleischaker, R. & Sinskey, A. 1981. Oxygen demand and supply in cell culture. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 12:193-197
- Franconi, F. 2000. NMDA receptors play an antiaggregating role in human platelets. **Thromb. Haemost.** 76:84-87
- Garnet, S. & Kaplan, H. 1980. Long-term culture of human bone marrow cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77:4756-4759
- Genever, P., Wilkinson, D., Patton, A., Peet, N., Hong Y., Mathur, A., Erusalimsky, J. & Skerry, T. 1999. Expression of a functional N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptor by bone marrow megakaryocytes. **Blood.** 93:2876-2883
- Gluckman, E., Broxmeyer, H. & Auerbach, A. 1989. Hematopoietic reconstitution of a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. **N. Engl. J. Med.** 321:1174-1178
- Gluckman, E. 2001. Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood. **N. Engl. J. Med.** 344:1860-1861

- Gluckman, E. 2000. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. **Exp. Hematol.** 28:1197-1205
- Gluckman, E. 1998. Cord blood banking and transplantation in Europe. En: Cellular characteristics of cord blood and cord blood transplantation. H.E. Broxmeyer (ed.). First edition. AABB Press. Maryland. USA
- Gutierrez, M., Reyes, E. & Mayani, H. 2001. Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. **Stem Cells.** 18:46-52
- Harris, D., Schumaker, M., Locascio, J., Besencon, F., Olson, G., DeLuca, D., Shenker, I., Bard, J. 1992. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89:10006-10010
- Higareda, A., Possani, L. & Ramírez, O. 1997. The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. **Biotechnol. Bioeng.** 56:555-563
- Higareda, A. 1994. Estrategias para optimizar la producción de anticuerpos monoclonales por cultivo de hibridomas en suspensión. **Tesis de Maestría en Biotecnología.** Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México : 37 - 39
- Hows, J., Bradley, B., Marsh, J., Luft, T., Coutinho, L., Testa, N. & Dexter, T. 1992. Growth of human umbilical cord blood in long term haemopoietic cultures. **Lancet.** 340:73-76
- Huerta, M. 2000. Caracterización del sistema hematopoyético en pacientes con linfoma. **Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas.** Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Iahikawa, Y. & Ito, T. 1988. Kinetics of hematopoietic stem cells in a hypoxic culture. **Eur. J. Haematol.** 40:126-129
- Jacobsen, S., Ruscetti, F., Dubois, C., Lee, J., Boone, T. & Keller, J. 1991. Transforming growth factor- β trans-modulates the expression of colony stimulating factor receptors on murine hematopoietic progenitor cell lines. **Blood.** 77:1706-1716
- Jorjani, P. & Ozturk, S. 1999. Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. **Biotechnol. Bioeng.** 64:349-356
- Kawano, M., Tanaka, H., Ishikawa, H., Nobuyoshi, M., Iwato, K., Asaoku, H., Tanabe, O. & Kuramoto, A. 1989. Interleukin 1 accelerates autocrine growth of myeloma cells through interleukin-6 in human myeloma. **Blood.** 73:2145-2148
- Kilburn, D. 1990. Monitoring and control of bioreactors. En: Mammalian cell biotechnology. M. Butler (ed). First edition. Oxford University Press. New York. USA

- Kim, B. 1998. Production of human hematopoietic progenitors in a clinical-scale stirred suspension bioreactor. **Biotechnol. Lett.** 20:595-601
- Kimura, T., Iijima, S. & Kobayashi, T. 1987. Effects of lactate and ammonium on the oxygen uptake rate of human cells. **J. Ferment. Technol.** 65:341-344
- Kishimoto, T., Akira, S., Taga, T. 1992. Interlukin 6 and its receptor. A paradigm for cytokines. **Science.** 258:593-597
- Koller, M., Manchel, I., Maher, R., Goltry, K., Armstrong, R. & Smith, A. 1998a. Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system. **Bone Marrow Transplant.** 21:653-663
- Koller, M., Palsson, M., Manchel, I., Maher, R. & Palsson, B. 1998b. Tissue culture surface characteristics influence the expansion of human bone marrow cells. **Biomaterials.** 19:1963-1972
- Koller, M., Emerson, S. & Palsson, B. 1993. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. **Blood.** 82:378-384
- Koller, M., Bender, J., Papoutsakis, E. & Miller, W. 1992a. Beneficial effects of reduced oxygen tension and perfusion in long-term hematopoietic cultures. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 665:105-116
- Koller, M., Bender, J., Papoutsakis, E. & Miller, W. 1992b. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. **Exp. Hematol.** 20:264-270
- Lanks, K. 1986. Glutamine is responsible for stimulating glycolysis by L929. **J. Cell. Physiol.** 321:319-321
- Lansdorp, P., Dragowska, W. & Mayani, H. 1993. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. **J. Exp. Med.** 178:787-791
- Laver, J., Duncan, E., Abboud, M., Gasparetto, C., Sahdev, I., Warren, D., Bussel, J., Auld, P., O'Reilly, R. & Moore, M. 1993. High levels of granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in cord blood of normal full-term neonates. **J. Pediatr.** 116:627-631
- Lavery, M. & Nienow, A. 1987. Oxygen transfer animal cell culture medium. **Biotechnol. Bioeng.** 30:368-373
- López, E. 1999. Cultivo y expansión *in vitro* de células hematopoyéticas humanas de sangre de cordón umbilical. **Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología.** Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Lord, B., Testa, N. & Hendry, J. 1975. The relative spatial distributions of CFU_s and CFU_c in the mouse femur. **Blood.** 46:65-72

- Lotem, J. & Sachs, L. 1992. Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor β 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. **Blood**. 80:1750-1757
- Kostanyan, I., Nurieva, R., Navolotskaya, E., Astapova, M., Dranitsina, S., Bogachuk, A., Zav'yalov, V. & Lipkin, V. 1998. Influence of L-glutamic acid on binding of interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and interleukin-6 to HL-60 cells. **Immunol. Lett.** 62:9-13
- Kussow, C., Zhou, W., Gryte, D. & Hu, W. 1995. Monitoring of mammalian cell growth and virus production process using on-line oxygen uptake rate measurement. **Enzyme Microb. Tech.** 17:779-783
- Mayani, H. & Lansdorp, P. 1998. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. **Stem Cells**. 16:153 – 165
- Mayani, H., Gutierrez, M., Espinoza, L., López, E., Huerta, A., Flores, E., Sánchez, E., Luna, F., Valenia, I. & Ramírez, O. 1998. Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. **Stem Cells**. 16:127-135
- Mayani, H., Guilbert, L. & Janowska, A. 1992. Biology of the hemopoietic microenvironment. **Eur. J. Haematol.** 49:225-233
- McAdams, T., Winter, J., Miller, W. & Papoutsakis, E. 1996. Hematopoietic cell culture therapies (part I): Cell culture considerations. **Trends Biotechnol.** 14:341-349
- McKeehan. 1982. Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. **Cell Biol. Internat. Rep.** 6:635-650
- Medina, M. & Nuñez de Castro, I. 1990. Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. **Int. J. Biochem.** 22:681-683
- Metcalf, D. 1985. The granulocyte macrophage colony stimulating factors. **Science**. 199:16-22
- Ogawa, M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**. 81:2844-2853
- Oh, D., Koller, M. & Palsson, B. 1994. Frequent harvesting from perfused bone marrow cultures results in increased overall cell and progenitor expansion. **Biotechnol. Bioeng.** 44:609-616
- Ono, K. & Anter, B. 1995. Effects of low oxygen tension and antioxidants on human erythropoiesis *in vitro*. **Exp. Hematol.** 23:1372-1377
- Ozturk, S. & Palsson, B. 1990. Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: Effect of media type, pH and serum concentration. **Biotechnol. Prog.** 6:121-128

- Palomares, L. & Ramírez, O. 1996. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. **Cytotechnol.** 22:225-237
- Palsson, B., Paek, S., Schwartz R., Palsson, M., Lee, G. & Silver, S. 1993. Expansion of human bone marrow progenitor cells in a high cell density continuous perfusion system. **Bio/technology.** 11:368-372
- Patel, S., Papoutsakis, E., Winter, J. & Miller, W. 2000. The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures. **Biotechnol. Prog.** 16:885-892
- Pecth, D. & Butler, M. 1994. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. **J. Cell. Physiol.** 161:71-76
- Peng, C. & Palsson, B. 1996. Determination of specific oxygen uptake rates in human hematopoietic cultures and implications for bioreactor design. **Ann. Biom. Eng.** 24:373-381
- Quesenberry, P. 1995. Hematopoietic stem cells, progenitor cells and cytokines. En: Williams Hematology. E. Beutler, M. Lichtman, B. Coller, T. Kipps (eds.). Fifth Edition. McGraw-Hill. New York. USA
- Ramírez, O. & Mutharasan, R. 1992. Effect of serum on the plasma membrane fluidity of hybridomas: An insight into its shear protective mechanism. **Biotechnol. Prog.** 8:40-50
- Rich, I. & Kubanek, B. 1982. The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells *in vitro*. **Brit. J. Haematol.** 52:579-588
- Ruffieux, P., Stockar, U. & Marison, I. 1998. Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (q_{O_2}) oxygen uptake rates in animal cell cultures. **J. Biotech.** 63:85-95
- Rocha, A. 1999. Efecto de la configuración impulsor-difusor sobre el cultivo tetrafásico de *Trichoderma harzianum*. **Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas**. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Roncarolo, M., Vaccari, E., Saracco, P., Miniero, R., Mandon, E. & Yssel, H. 1998. Immunologic properties of cord blood. En: Cellular characteristics of cord blood and cord blood trasplantation. H.E. Broxmeyer (ed.). First edition. AABB Press. Maryland. USA
- Rotem, A., Toner, M., Bhatia, S., Foy, B., Tompkins, R. & Yarmush, L. 1994. Oxygen is a factor determining *in vitro* tissue assembly: Effects on attachment and spreading of hepatocytes. **Biotechnol. Bioeng.** 43:654-660
- Sachs, L. 1986. Growth, differentiation and the reversal of malignancy. **Sci. Am.** 254:40-47
- Sachs, L. 1987. The molecular control of blood cell development. **Science.** 223:1374-1379
- Sachs, L. & Lotem, J. 1994. The network of hematopoietic cytokines. **Soc. Exp. Biol. Med.** 206:170-175

- Sandstrom, C., Bender, J., Miller, W. & Papoutsakis, E. 1996. Development of novel perfusion chamber to retain nonadherent cells and its use for comparison of human "mobilized" peripheral blood mononuclear cell cultures with and without irradiated bone marrow stroma. **Biotechnol. Bioeng.** 50:493-504
- Sardonini, C. & Wu, Y. 1993. Expansion and differentiation of human hematopoietic cells from static cultures through small-scale bioreactors. **Biotechnol. Prog.** 9:131-137
- Serre, C., Farlay, D., Delmas, P. & Chenu, C. 1999. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. **Bone.** 25:623-629
- Singh, V. 1996. On-line measurement of oxygen uptake in cell culture using the dynamic method. **Biotechnol. Bioeng.** 52:443-448
- Skerry, T. & Genever, P. 2001. Glutamate signaling in non-neuronal tissues. **Trends. Pharmacol. Sci.** 22:174-181
- Spielholz, C., Heaney, M., Morrison, M., Houghton, A., Vera, J. & Golde, D. 1995. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signals for increased glucose uptake in human melanoma cells. **Blood.** 85:973-980
- Taguchi, H. & Humphrey, A. 1966. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **J. Ferment. Technol.** 44:881-889
- Tanaka, Y., Adams, D., Hunsher, S., Hirano, H., Siebenlist, O. & Shaw, S. 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan immobilized cytokine MIP-1 β . **Nature.** 36:79-82
- Thompson, C. 1995. Umbilical cords: turning garbage into clinical gold. **Science.** 268:805-806
- Varma, A., El-Awar, F., Palsson, B., Emerson, S. & Clarke, M. 1992. Can Dexter culture support stem cell proliferation? **Exp. Hematol.** 20:87-91
- Verfaillie, C. & Catanzaro, P. 1996. Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells. **Leukemia.** 10:498-504
- Verfaillie, C. 1992. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term *in vitro* hematopoiesis. **Blood.** 79:2821-2826.
- Villaseñor, F. 1998. Evaluación de los sistemas enzimáticos glutamino sintetasa y glutamato deshidrogenasa para la eliminación de amonio del medio de cultivo de células eucariotes superiores. **Tesis de Maestría.** Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Wagner, J. & Kurtzberg, J. 1998. Allogeneic umbilical cord blood transplantation. En: Cellular characteristics of cord blood and cord blood transplantation. H. Broxmeyer (ed.). AABB Press. Primera edición. Maryland, USA

- Wice, B., Reitzer, L. & Kennell, D. 1981. The continuous growth of vertebrate cells in the absence of sugar. **J. Biol. Chem.** 256:7812-7819
- Wilson, K., Addie, G. & Clift, R. 1992. Slurry transport using centrifugal pumps. Elsevier Applied Science. London. 41-53
- Yamada, K., Furushou, S., Sugahara, T., Shirahata, S. & Murakami, H. 1990. Relationship between oxygen consumption rate and cellular activity of mammalian cells cultured in serum-free media. **Biotechnol. Bioeng.** 36:759-762
- Ye, A., Burkholder, J., Qiu, P., Schults, J., Shaidi, N, & Yang, N. 1994. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91:12140-12144
- Yoon, S. & Konstantinov, K. 1994. Continuous real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.** 44:983-990
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B., Gurrola, G., Herion, P. & Possani, L. 1992. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from venom of scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. **J. Biochem.** 204:281-292
- Zandstra, P., Petzer, A., Eaves, C. & Piret, J. 1997. Cellular determinants affecting the rate of cytokine depletion in cultures of human hematopoietic cells. **Biotechnol. Bioeng.** 54:58-66
- Zandstra, P., Eaves, C. & Piret, J. 1994. Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells. **Bio/technology.** 12:909-914
- Zielke, H., Ozand, P., Tildon, J., Sevdalian, D. & Cornblath, M. 1976. Growth of human diploid fibroblasts in the absence of glucose utilization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 73:4110-4114
- Zigmond, M., Bloom, F., Landis, S., Roberts, J. & Squiere, L. 1999. Fundamental neuroscience. Academic Press. San Diego. USA

9. APÉNDICES

Apéndice A.

Expresiones para el cálculo de la velocidad terminal para partículas granulares de forma irregular

<i>Secuencia de cálculo</i>
$d^* = \sqrt[3]{\frac{\rho_F(\rho_S - \rho_F)g}{\mu_F^2}}$
$W = \log(d^*)$
$v_{if} = \sqrt[3]{\frac{\mu_F(\rho_S - \rho_F)g}{\rho_F^2}}$
si $d^* \leq 3.8$
$V_{is}^* = (d^*)^2 / 18 - 3.1234 \times 10^{-4} (d^*)^5 + 1.6415 \times 10^{-6} (d^*)^8 - 7.278 \times 10^{-1} (d^*)^1$
si $d^* \leq 7.58$
$V_{is}^* = -1.15446 + 2.9162W - 1.0432W^2$
si $d^* \leq 227$
$V_{is}^* = -1.64758 + 2.94786W - 1.09703W^2 + 0.17129W^3$
si $d^* \leq 3500$
$V_{is}^* = 5.1837 - 4.51034W + 1.687W^2 - 0.189135W^3$
$V_{il} = V_{is}^* V_{if}$
Corrección debida a la forma de las partículas
$D_1 = -0.55 + k_v - 0.0015k_v^2$
$D_2 = 0.03 * 1,000^{(k_v - 0.524)}$
$D = D_1 + D_2$
$A_1 = -0.045 + 0.05k_v^{-0.6}$
$A_2 = -0.0287 * 55,000^{(k_v - 0.524)}$
$A = A_1 + A_2$
$EPS = 10^{(D + A * 1 / \cosh(2.55 * (W - 1.114)))}$
$V_T = V_{il} * EPS$
Velocidad terminal de una partícula irregular

Apéndice B

Ecuaciones de ajuste a las cinéticas de los sustratos y metabolitos

Sustrato o Metabolito	C. petri ^a	C. petri ^b	Frasco T 25 cm ²	Frasco T75 cm ²
Glucosa	$[G] = a \exp(bt)$ a=3.89; b=-0.002; R ² =63%	$[G] = a \exp(bt)$ a=4.76; b=-0.004; R ² =25%	$[G] = a \exp(bt)$ a=3.74; b=-0.009; R ² =77%	$[G] = a \exp(bt)$ a=3.49; b=-0.007; R ² =78%
Glutamina	$[Gln] = a \exp(bt)$ a=2.70; b=-0.037; R ² =89%			
Lactato	$[Lac] = \frac{a}{1 + b \exp(-ct)}$ a=1.01; b=4.94; c=0.21 R ² =75%	$[Lac] = \frac{a}{1 + b \exp(-ct)}$ a=1.22; b=6.92; c=0.24 R ² =91%	$[Lac] = a(1 - \exp(-bt))$ a=1.18; b=0.07; R ² =93%	$[Lac] = a(1 - \exp(-bt))$ a=1.18; b=0.08; R ² =73%
Glutamato	$[Glu] = \frac{(a + bt)}{(1 + ct + dt^2)}$ a=0.59; b=0.025; c=-0.064; d=0.012; R ² =91%			