



Células madre y su aplicación biotecnológica



Ruth Mélida Sánchez Mora
Gabriela Arévalo Pinzón
Olga Lucía Ostos Ortiz



Células madre y su aplicación biotecnológica

Células madre y su aplicación biotecnológica

Ruth Mélida Sánchez Mora
Gabriela Arévalo Pinzón
Olga Lucía Ostos Ortiz



Sánchez Mora, Ruth Mélida

Células madre y su aplicación biotecnológica / Ruth Mélida Sánchez Mora, Gabriela Arévalo Pinzón y Olga Lucía Ostos Ortiz; primera edición. Bogotá: Ediciones USTA, 2022.

127 páginas; ilustraciones, gráficas y tablas.

Incluye referencias bibliográficas e índices de autores y temático.

ISBN: 978-958-782-499-5

E-ISBN: 978-958-782-500-8

1. Células madre 2. Células madre hematopoyéticas 3. Medicina regenerativa 4. Células madre - Investigación I. Universidad Santo Tomás (Colombia).

CDD 611.0181

CO-BoUST



© Ruth Mélida Sánchez Mora, Gabriela Arévalo Pinzón, Olga Lucía Ostos Ortiz, autoras, 2022

© Universidad Santo Tomás, 2022

Ediciones USTA

Bogotá, D. C., Colombia

Carrera 9 n.º 51-11

Teléfono: (+571) 587 8797, ext. 2991

editorial@usantotomas.edu.co

<http://ediciones.usta.edu.co>

Corrección de estilo: Margarita Mejía

Diagramación y montaje de cubierta: Martha Cadena

Impresión: DGP Editores S. A. S.

Hecho el depósito que establece la ley

ISBN: 978-958-782-499-5

E-ISBN: 978-958-782-500-8

Primera edición, junio de 2022

Universidad Santo Tomás

Vigilada Mineducación

Reconocimiento personería jurídica: Resolución 3645 del 6 de agosto de 1965, Minjusticia

Acreditación Institucional de Alta Calidad Multicampus: Resolución 01456 del 29 de enero de 2016, 6 años, Mineducación

Se prohíbe la reproducción total o parcial de esta obra, por cualquier medio, sin la autorización expresa del titular de los derechos.

Contenido

PREFACIO	13
GENERALIDADES DE LAS CÉLULAS MADRE RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA	15
CULTIVO DE CÉLULAS MADRE GABRIELA ARÉVALO PINZÓN RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA	25
APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE OLGA LUCÍA OSTOS ORTIZ RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA	69
BIOFABRICACIÓN DE COMPUESTOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE Y BIOPROCESOS RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA	99
SOBRE LAS AUTORAS	123
ÍNDICE TEMÁTICO	125

Lista de siglas y abreviaturas

ACFM	manipulador de fábrica de células automatizado
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
bFGF	factor básico de crecimiento de fibroblastos
BMP	proteína morfogenética ósea
CAR	células alimentadoras aisladas de ratón
CAT	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CCL2	proteína-1 quimioatrayente de monocitos 1
CE	células endoteliales
CGH	hibridación genómica comparativa
CM	células madre
CMA	células madre adultas
CMC	células madre cancerosas
CME	células madre embrionarias
CMH	células madre hematopoyéticas
CMH-I	complejo mayor de histocompatibilidad clase I
CMH-II	complejo mayor de histocompatibilidad clase II
CMH-CP	CMH a corto plazo
CMH-LP	CMH a largo plazo
CMM	células madre mesenquimales
CMMTA	CMM derivadas de tejido adiposo autólogo
CMPi	células madre pluripotenciales inducidas
c-Myc	homólogo celular del oncogén del virus de la mielocitomatosis aviar
CoA	coenzima A
CPVT	taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica
CU	cordón umbilical

CVC	congeladores de velocidad controlada
DA	células de dopamina
DM	diabetes mellitus
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	duplicaciones de la población
EA	enfermedad de Alzheimer
EC	enfermedad de Crohn
EEC	espacio extracapilar
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EIC	espacio intracapilar
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
EM	esclerosis múltiple
EP	enfermedad de Parkinson
FFT	filtración de flujo tangencial
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FISH	hibridación in situ con fluorescencia
FT	factores de transcripción
FTA	filtración tangencial alternativa
FVE	fracción vascular estromal
GAG	glicosaminoglicanos
GM-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
GPT2	transaminasa glutámico-pirúvica 2
GVHD	enfermedad de injerto contra huésped
HGF	factor de crecimiento de hepatocitos
HLA-G5	antígeno leucocitario humano G5
HNF-4 α	factor nuclear 4 α del hepatocito
HO-1	hemo-oxigenasa 1
IAM	infarto agudo de miocardio
IDO	indoleamina 2,3-dioxigenasa
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-1 β	interleucina 1 β
ISCT	International Society of Cellular Therapy
Klf4	factor 4 similar a Krüppel
LDHA	lactato deshidrogenasa A
LES	lupus eritematoso sistémico
LQTS	síndrome de QT largo
MCI	masa celular interna
MCP-1	citocinas proteína quimiotáctica de monocitos
MEC	matriz extracelular

MEM	medio esencial mínimo
MIP-1	proteína inflamatoria macrofágica-1
MLCK	cinasa de la cadena ligera de miosina
MMP1	metaloproteinasa 1 de matriz
MO	médula ósea
MPM	metaloproteasas de matriz
NGF	factor de crecimiento nervioso
NO	monóxido de nitrógeno
Oct-4	proteína de unión octamérica-4
PBS	tampón fosfato salino
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PEG	polietilenglicol
PGE2	prostaglandina E2
PLC	policaprolactona
PNIPAAm-PEG	poli(N-isopropilacrilamida) y poli(etilenglicol)
PPC	procesamiento posterior de células madre
PTI	púrpura trombocitopenia inmune
RIST	trasplante alogénico de CM de intensidad reducida
RLF	reactores de lecho fijo
ROCK	proteína cinasa asociada a Rho
RTA	reactor de tanque agitado
Runx2	factor de transcripción 2 relacionado con Runt
SAM	S-adenosilmetionina
SBRN	suero de becerro recién nacido
SFB	suero fetal bovino
Sox2	región determinante del sexo Y
SSc	esclerosis sistémica
STC-1	estaniocalcina-1
STF	suero fetal de ternero
TGF- β	factor de crecimiento transformante β -relacionado
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
Treg	linfocitos T reguladores
TSG-6	proteína del gen 6 estimulada por TNF
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
YAP	proteína asociada a Yes (por sus siglas en inglés)

Prefacio

Para las docentes Ruth Mélida Sánchez Mora, Gabriela Arévalo Pinzón y Olga Lucía Ostos Ortiz es un logro presentar una obra que permite recopilar los principales conceptos de las células madre (CM) y sus aplicaciones en el área de la biotecnología. Resulta interesante lograr comprender los múltiples mecanismos celulares y moleculares que esconden estas células, los elementos esenciales requeridos para cultivarlas y sus principales aplicaciones. Estos conocimientos permitirán a nuestros estudiantes adquirir una mayor comprensión del uso de las células madre en las diferentes áreas de la biotecnología y en áreas afines.

La capacidad autorregenerativa de las CM es, sin duda, una de las principales propiedades de estas células, que ha sido utilizada en procesos de regeneración celular, ya sea para remplazo o para recuperación celular de tejidos y órganos. Estas células también tienen la habilidad de producir diferentes compuestos farmacológicos y toxicológicos que amplían el conocimiento en el área de la medicina. Por otra parte, gracias a sus propiedades antiinflamatorias, antifibróticas regenerativas y antimicrobianas, las CM se sitúan como un recurso biológico interesante. Sin embargo, existen aún brechas en su conocimiento; por ejemplo, en la comprensión de los mecanismos de señalización, en el reconocimiento de subpoblaciones, en la caracterización

y optimización de expansión, y en el tipo de fuente para su obtención o aislamiento, entre otras. Por consiguiente, el cultivo de CM a gran escala y bajo condiciones dinámicas es una prioridad en la actualidad. Para ello, el uso de biorreactores —una herramienta útil en diversas áreas del conocimiento científico— resulta de suma importancia y deja atrás el cultivo celular estático (en caja de Petri o en frasco).

El objetivo de este libro es profundizar en los procesos moleculares y celulares de las CM y mostrar sus diferentes usos biotecnológicos. Para tal fin, el libro se ha dividido conceptualmente en cuatro capítulos. En el primero se hace una revisión general del conocimiento biológico de las CM y del papel que cumplen. En el segundo capítulo se abordan los diferentes componentes nutricionales y métodos de cultivo de estas células, mientras que en el tercer capítulo se abordan las diferentes aplicaciones y usos biotecnológicos. El cuarto capítulo tiene como tema principal la biofabricación de compuestos; describe un bioproceso donde el empleo de biorreactores da lugar a su uso en futuras investigaciones. Por último, se hace una valoración sobre estos bioprocursos y el uso de CM como agentes terapéuticos.

Para los interesados en el tema, cada capítulo incluye bibliografía consultada: artículos de revisión, libros más especializados y artículos de la literatura original. Algunas de estas referencias pueden ser difíciles de seguir para algunos principiantes; sin embargo, son hitos históricos o contienen algún aspecto valioso.

Generalidades de las células madre

RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA

Desde que se descubrieron las células madre (CM) en el siglo XIX hasta hoy, los adelantos alcanzados en este tema son numerosos. Por ser células cuya principal característica es la autorrenovación o proliferación, el avance en el conocimiento e investigación sobre su valor biológico —tanto en sus factores de replicación como en los de activación, proliferación y diferenciación— permite el desarrollo de tratamientos enfocados en el uso de estas células para una gran variedad de enfermedades.

Una CM o célula troncal es aquella que es capaz de dividirse en forma indefinida y diferenciarse en distintos tipos de células especializadas, no solo en cuanto a su morfología sino también en lo funcional. Son células cuyo “destino” aún no está definido; son indiferenciadas, no están especializadas, son inmaduras y tienen la capacidad de modificar su fenotipo.

Alexis Carrel —cirujano y Premio Nobel de Medicina— fue uno de los primeros investigadores en CM. En 1912, colocó un corazón de embrión de pollo en medio nutritivo y observó que cada 48 horas doblaba su tamaño. En 1960, Ernest McCulloch y James Till inyectaron células de médula ósea (MO) en ratones irradiados para mirar los efectos de la radiación en la hematopoyesis; encontraron crecimiento en el bazo proporcional al número de células inyectadas.

Las células madre hematopoyéticas (CMH) se originan desde el inicio de la vida fetal y se encargan del proceso de hematopoyesis, que genera cerca de 2×10^{11} eritrocitos y 10^{10} células blancas por día. Estas

células son multipotentes, tienen un alto potencial proliferativo y una alta capacidad de generación de más células idénticas a la progenitora; se clasifican en CMH a largo plazo (CMH-LP) y CMH a corto plazo (CMH-CP). Las CMH-LP dan origen a todas las células maduras de la sangre y progenitores hematopoyéticos mientras que las CMH-CP generan células progenitoras comprometidas con linajes específicos (linfoide o mieloide). Hay estudios que establecen la posibilidad de que las CMH-LP generen las CMH-CP.

La hematopoyesis tiene lugar en la MO, la cual provee un microambiente específico (células y citocinas) que puede inducir o inhibir la proliferación o diferenciación de las CMH, según las necesidades del organismo; la diferenciación da origen a osteocitos, eritrocitos, linfocitos B y linfocitos T, basófilos/mastocitos, eosinófilos, neutrófilos/granulocitos, monocitos/macrófagos y también a megacariocitos/plaquetas.

En 1968, Friedenstein y colaboradores describieron por primera vez las células madre mesenquimales (CMM). Durante 1981, Martin Evans y Matthew Kaufman lograron aislar células madre embrionarias (CME) a partir del blastocisto de ratón. Pero solo hasta finales del siglo XX, Ernest Haeckel tomó el término de CM y las definió como células primordiales, que se diferencian en distintos tipos celulares y en organismos multicelulares.

Propiedades de las células madre

- **División celular** simétrica o asimétrica, de acuerdo con el tipo de estimulación: *in vitro*, por medio de factores de transcripción (FT); e *in vivo*, según la composición del microambiente celular y los requerimientos del organismo. Las CM son definidas por su capacidad de producir una CM y una célula diferenciada mediante una división celular asimétrica. El número de CM se mantendrá constante si únicamente se lleva a cabo la división simétrica, siempre y cuando en cada ciclo una CM pueda dar lugar a dos CM hijas. La división simétrica de las CM provee un mecanismo para incrementar la población de CM después de una pérdida de estas; pero también puede conducir a un

ascenso peligroso en el número de CM que encaminará hacia la letalidad, la expansión y a lesiones similares a los tumores. Esta división da origen a la autorrenovación y la derivación.

- **Autorrenovación:** permite que la célula madre produzca más CM, que se multiplicarán y se conservarán indiferenciadas. La división celular es simétrica (división mitótica en donde una CM origina dos células hijas totalmente idénticas) y permite incrementar el número de CM después de una pérdida o mantener la población. Los análisis de autorrenovación de estas células han demostrado que los telómeros de los cromosomas son más largos que los de cualquier otra célula del organismo.
- **Derivación:** esta característica permite que la CM produzca uno o varios tipos de células diferenciadas (células cutáneas, hepatocitos, miocitos, neuronas, etc.), lo que da lugar a células especializadas según el microambiente celular, ya sea *in vivo* o *in vitro*. La derivación se realiza por una división celular asimétrica que tiene como objetivo reparar o regenerar un tejido, y da como resultado una célula diferenciada en otro tipo celular.
- **Potencialidad:** es la capacidad de una célula para diferenciarse en diversos tipos celulares. Esta actividad se lleva a cabo gracias a la activación o silenciamiento de genes; un ejemplo son los genes que codifican para los FT, los cuales pueden actuar solos, o en un complejo, sobre enzimas como la ADN polimerasa.

Estas características distintivas de las CM permiten que, en condiciones experimentales, puedan ser inducidas a células diferenciadas a través de procesos de inducción celular, por medio de la configuración de microambientes celulares *in vitro*. Esto ha permitido su amplio uso en investigación.

Clasificación de las células madre

Existen dos criterios de clasificación de las CM: 1. De acuerdo con su potencial de diferenciación, se dividen en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales. 2. Según el tejido de origen, en CME y células madre adultas (CMA) (figura 1).

Clasificación por su potencial

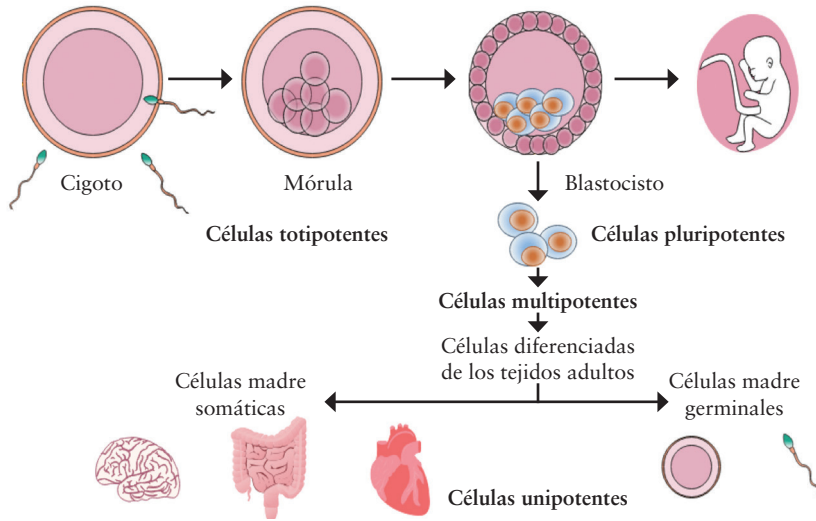
Totipotentes: crecen y forman un organismo completo que contiene los componentes embrionarios y extraembrionarios. Es decir, cualquier célula totipotente tiene la capacidad para dividirse y producir todas las células diferentes en el organismo. Ejemplos de células totipotentes son las esporas y el cigoto. En el espectro potencial, la totipotencia representa a la célula con la mayor capacidad de diferenciación.

Pluripotentes: son capaces de producir la mayor parte de los tejidos de un organismo, a excepción del embrión. La pluripotencia (del latín *plurimus*, “muchos”) se refiere a una CM que tiene la potencia para diferenciarse en cualquiera de las capas germinativas: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, aparato urogenital) o ectodermo (epidermis y sistema nervioso). Sin embargo, la pluripotencia es un continuo: desde la célula del todo pluripotente que puede formar cada célula del embrión propiamente dicho —esto es, CME y células madre pluripotenciales inducidas (CMPi)— hasta la célula parcialmente pluripotente que puede formar células de todas las capas germinativas, pero no puede exhibir todas las características de una célula por completo pluripotente.

La pluripotencialidad depende de tres factores de transcripción: (1) la proteína de unión octamérica-4 (oct-4), que se expresa en etapas tempranas del desarrollo embrionario uniéndose al ácido desoxirribonucleico (ADN) y es indispensable en la reprogramación de las CMPi. (2) El gen Sry-box, que codifica para la proteína Sox-2 y es esencial en el mantenimiento de la autorrenovación de las CM; además, se encuentra implicado en la activación del gen *fgf-4*, que codifica para una proteína de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); el gen *fgf-4* se expresa en la masa celular interna del blastocisto al interactuar con oct-4. (3) Y el homeobox Nanog, fundamental en la pluripotencialidad; se ha demostrado que sin su expresión no tendría lugar esta propiedad, puesto que las células quedarían en estado prepluripotencial, es decir, en un estado indeterminado donde no es posible la diferenciación ni la proliferación, lo cual no es viable.

Figura 1. Tipos de CM según su potencial de diferenciación.

Teniendo en cuenta el potencial de diferenciación se dividen en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales



Tomada y modificada de Mata-Miranda, 2013.

Células madre multipotentes: también llamadas CM órgano-específicas, son capaces de originar las células de un órgano concreto en el embrión y también en el adulto. Por ejemplo, las CMH de la MO pueden generar todos los tipos celulares de la sangre y del sistema inmune. Estas CM existen también en piel, grasa subcutánea, músculo cardíaco y esquelético, cerebro, retina y páncreas. Se pueden diferenciar en muchos tipos de células, pero dentro de un linaje particular, ya sea mesodermo, endodermo o ectodermo.

A su vez, estas se dividen en CMM, denominadas así por su capacidad de diferenciarse en células especializadas que se desarrollan a partir del mesodermo. Se caracterizan por ser accesibles, seguras y tener gran potencial para la medicina regenerativa. Se encuentran en tejidos adultos de diferentes fuentes y diversas especies (desde el modelo murino hasta el humano); son de fácil cultivo *in vitro* y tienen una alta estabilidad genómica, lo que marca su importancia en la terapia celular, la medicina regenerativa y la reparación de tejidos. Las CMM cuentan

con tres atributos básicos que las hacen interesantes en investigación y para terapia celular (figura 2):

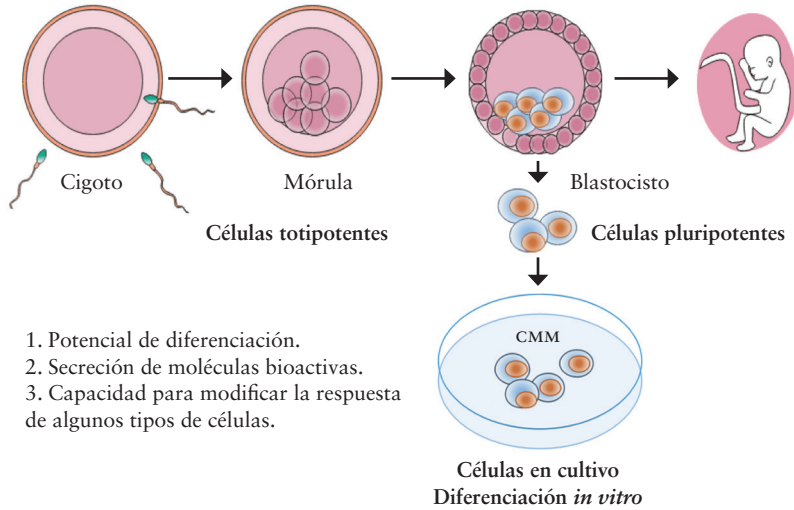
1. Su potencial de diferenciación.
2. Su capacidad para secretar moléculas bioactivas, como citocinas y factores de crecimiento, que promueven la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas, además de ejercer efectos regenerativos.
3. Su capacidad para modificar la respuesta de las células inflamatorias inmunes; además, se consideran ideales para trasplante alogénico, ya que presentan baja cantidad de complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH-I) y carecen de CMH-II.

Por estas razones, el efecto antiproliferativo, inmunomodulador y antiinflamatorio de las CMM las convierte en agentes potenciales terapéuticos en enfermedades del sistema inmunológico; por ejemplo, en la enfermedad injerto contra huésped, en enfermedades autoinmunes y en el rechazo posterior a un trasplante de órganos. Esto ha impulsado el llamado a cambiar la denominación de CMM por células de señalización, con el fin de evidenciar de forma más real su potencial de acción.

Las CMM secretan factores de crecimiento de acción paracrina que modulan el microambiente de los tejidos dañados, promueven su supervivencia y activan mecanismos de reparación endógena. Al secretar factores paracrinicos, regulan la permeabilidad endotelial y epitelial, disminuyen la inflamación, reparan tejido dañado e inhiben el crecimiento bacteriano. Atenúan las citocinas proinflamatorias, lo que disminuye el daño sistémico y activa la fagocitosis por macrófagos y monocitos, como efecto antimicrobiano.

Es más factible usar CMM como terapia celular, pues estas células pueden obtenerse con facilidad por aspirado de médula ósea o liposucción. Sin embargo, varios autores resaltan el tejido adiposo como fuente excepcional que, a diferencia de la extracción en MO, ofrece baja morbilidad. De igual forma, a partir de tejido adiposo se puede obtener una mayor cantidad de células; mientras que en MO, por cada 60-70 mL de aspirado medular se recolecta entre 0.001 % y 0.01 % de CMM, en un lipoaspirado se obtiene 40 veces más.

Figura 2. Atributos básicos de las CMM.



Tomada y modificada de Mata-Miranda, 2013.

Sumado a esto, se prefiere usar fuentes diferentes a MO debido a limitaciones como la edad del paciente. De igual modo, resulta compleja la extracción del cordón umbilical, debido a que se requiere efectuar la recolección en menos de 16 horas y la cantidad de muestra obtenida debe ser mayor de 30 mL para que el aislamiento de CM sea adecuado.

Células madre unipotentes o progenitoras: son células que pueden diferenciarse a lo largo de solo un linaje; se encuentran en tejidos adultos. Una célula madre unipotente (CMU) tiene el potencial más bajo de diferenciación, lo que significa que la célula tiene la capacidad de diferenciarse en un solo tipo de célula o tejido. Por ejemplo, las células madre musculares, también denominadas células satélite, solo pueden diferenciarse en células musculares.

Clasificación por origen

Las CM pueden proceder de tejido embrionario o de un organismo adulto; de ahí que se las denomine CME y CMA, respectivamente. Las primeras, las CME, corresponden a precursores totipotenciales con

capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro*, por lo general, aisladas de la masa celular interna (MCI) del blastocisto. Se caracterizan por diferenciarse en cualquier célula madura de las tres líneas germinales (ectodermo, mesodermo o endodermo) y mantener una estabilidad genómica; por ello, gran parte de las investigaciones se han centrado en la producción de distintos tipos de tejidos e incluso de órganos simples, así como en la incorporación de genes foráneos, lo que convierte a este tipo de células en un vehículo idóneo para la terapia génica paliativa y en una firme promesa para la medicina futura. Sin embargo, tiene consecuencias éticas y alto potencial tumorigénico, ya que se ha visto que en ratones inmunodeficientes pueden generarse teratomas y rechazo inmunológico.

Las CMA, por su parte, corresponden a progenitores multipotenciales que pueden renovarse de modo constante y dar lugar a células especializadas capaces de reparar lesiones tisulares y de renovar células seniles. Así mismo, presentan una gran versatilidad biológica, fundamentada en su capacidad de alterar en forma drástica el fenotipo, en respuesta a los cambios del microambiente en donde se desarrollan.

Las CMPi se generan a partir de CMA que se expanden en cultivo y son sujetas a “reprogramación” mediante la expresión forzada de factores de transcripción (FT) tales como Oct3/4 (factor de unión a octámeros), Sox2 (región determinante del sexo Y), Klf4 (factor 4 similar a Krüppel) y c-Myc (homólogo celular del oncogén del virus de la mielocitomatosis aviar)— mediante el uso de vectores retrovirales. Poseen capacidad de autorrenovación y potencial de diferenciación. Pueden ser usadas en terapia celular, pero varios estudios han cuestionado su estabilidad genómica, debido a que pueden diferenciarse de forma inesperada y adquirir potencial teratogénico.

Las CMPi surgen como una necesidad ante los problemas bioéticos del uso de las CME, debido a que los métodos para aislarlas representan una cuestión bioética y normativa al emplear embriones como fuente de extracción. A pesar de que han sido varios los esfuerzos por implementar tecnologías que no impliquen el daño total de los embriones usados, estas no son efectivas y muchos países a nivel mundial han prohibido este tipo de experimentación; además, requieren

condiciones especiales de mantenimiento y presentan tendencia al desarrollo de teratomas y de tumores hamartomatosos.

Las CMPi pueden obtenerse por medio de técnicas artificiales como:

- Transferencia nuclear: se coloca el núcleo de una célula diferenciada en un ovocito sin núcleo; el citoplasma contiene elementos que modifican la expresión génica de la cromatina del ovocito.
- Reprogramación con FT: se adicionan FT (Oct4, Sox2, Klf4 y Myc) que remodelan la cromatina del citoplasma de la célula diferenciada.

Ambos métodos aún se están perfeccionando; se ha podido ver que la transferencia del núcleo es mejor porque muestra menor cantidad de residuos de metilación; además, en la reprogramación con FT, las células presentan una tendencia a diferenciarse en su tipo celular de origen.

Bibliografía consultada

- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. y Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230-247. <https://doi.org/10.1097/00007890-196803000-00009>
- Hao, J., Ma, A., Wang, L., Cao, J., Chen, S., Wang, L., Fu, B., Zhou, J., Pei, X., Zhang, Y., Xiang, P., Hu, S., Li, Q., Zhang, Y., Xia, Y., Zhu, H., Stacey, G., Zhou, Q. y Zhao, T. (2020). General requirements for stem cells. *Cell Prolif.*, 53(12), e12926. <https://doi.org/10.1111/cpr.12926>
- Khan, F. A., Almohazey, D., Alomari, M. y Almoftly, S. A. (2018). Isolation, culture, and functional characterization of human embryonic stem cells: current trends and challenges. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2018/1429351>
- Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G. J. y Sánchez-Monroy, V. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatol. Reprod. Hum.*, 27(3), 194-199.
- Sart, S. y Agathos, S. N. (2018). Towards Three-Dimensional Dynamic Regulation and In Situ Characterization of Single Stem Cell Phenotype Using Microfluidics. *Molecular Biotechnology*, 60(11), 843-861. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0113-4>

Schmidt, S., Lilienkamp, A. y Bradley, M. (2018). New substrates for stem cell control. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 373(1750). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0223>

Cultivo de células madre

GABRIELA ARÉVALO PINZÓN
RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA

Los cultivos de CM efectuados a través del tiempo han permitido el estudio de los mecanismos de acción y rutas metabólicas de diferentes patologías, el ensayo de fármacos y el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos. En la actualidad, los avances tecnológicos en todos los ámbitos científicos han sido revolucionarios —como nuevos equipos, materias primas altamente sofisticadas y herramientas moleculares— y han permitido incursionar en campos prometedores para enfrentar las enfermedades humanas. Hoy es posible hablar de terapias celulares, generación de tejidos y caracterización de enfermedades, e investigar a profundidad mediante la experimentación en condiciones muy similares a las que se presentan *in vivo*. Esto conlleva pensar que el conocimiento se sigue generando y renovando en beneficio de la humanidad; además, produce grandes expectativas frente a la investigación con CM.

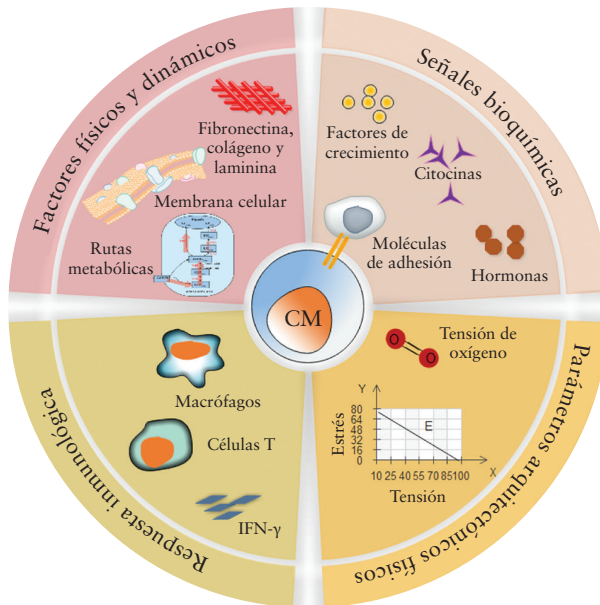
Para el adecuado crecimiento de las CM se requiere un microambiente. En el entorno *in vivo*, estas células se encuentran en microambientes específicos que las protegen de señales inductoras de maduración o proliferación, regulan su fisiología celular y les permiten el contacto con otros tipos celulares. En un entorno *in vitro*, el cultivo provee suplementos y aditivos que se constituyen en el microambiente indispensable para un adecuado desarrollo celular, un aspecto fundamental en los cultivos de CM.

Microambiente para el cultivo de células madre

Los microambientes necesarios para el desarrollo celular son multifactoriales y complejos, además de únicos y específicos para que la CM pueda funcionar. En conjunto, regulan el comportamiento celular, incluidas la propagación celular, la migración, la diferenciación, la autorrenovación y la quiescencia, lo que permite generar modelos de enfermedad.

En general, los microambientes comprenden factores físicos y dinámicos, como componentes celulares heterólogos e interacciones entre células; varias señales bioquímicas, como sitios de adhesión celular y factores insolubles; además de parámetros arquitectónicos físicos, tensión de oxígeno, control metabólico, topografía, porosidad y rigidez; factores de activación, respuesta inmunológica, componentes y estructura de las proteínas de la MEC (matriz extracelular). Todos estos factores se deben tener en cuenta en el cultivo celular (figura 3).

Figura 3. Componentes del microambiente de CM para la diferenciación y la autorrenovación



Tomada y modificada de Donnelly, 2018.

Los cultivos de CM permiten su expansión, y ofrecen un microambiente especializado (nicho/microentorno) y una MEC, es decir, proporcionan factores físicos y funcionales extrínsecos que retroalimentan y median el comportamiento celular *in vitro*. Los sistemas de cultivo se eligen de acuerdo con las necesidades y requerimientos; existen diversas matrices que ofrecen tecnologías con el fin de mejorar la expansión celular, reducir costos y sobrellevar una mejor calidad. La MEC juega un papel importante para el crecimiento de una célula madre.

La matriz extracelular

La MEC es una red de proteínas fibrilares y polisacáridos que anclan las células dentro de su microentorno específico. Representa una parte constitutiva clave del microambiente; desempeña un papel esencial en la regulación del comportamiento celular, y apoya el desarrollo, la función y la reparación de células y órganos. Las propiedades físicas de la MEC (topografía, porosidad, rigidez) tienen un impacto en las funciones biológicas relacionadas con la propagación celular, la división, la migración o la polaridad del tejido. Además, la MEC proporciona señales bioquímicas que regulan el fenotipo celular.

Para comprender las propiedades de la interfaz de los biomateriales, la forma como la rigidez, la topografía y la química pueden regular el comportamiento celular, primero se debe considerar cómo se adhieren las células a los sustratos.

La adherencia celular a los sustratos se da a través de las integrinas, que son receptores transmembrana que se unen a ligandos celulares-adhesivos específicos presentados por las proteínas de la MEC; así, conectan la MEC al citoesqueleto de actina intracelular y forman una capa intermedia de proteínas adsorbidas sobre la superficie. Estas interacciones generan cascadas de señalización intracelular; en principio se da la activación de la proteína G, que a través de la vía de la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK) conduce a la fosforilación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), aumentando la contractilidad de actina-miosina, y causando el agrupamiento de integrina y la formación de adhesión celular. La formación de adherencias es dinámica; las células utilizan proyecciones de membrana

separadas y activadas por actina denominadas *filopodios*, para sondear el ambiente externo.

La MEC y las uniones celulares circundantes tienen una gran influencia física en la transmisión de fuerzas entre células (mecánica); en última instancia, regulan las vías de señalización intracelular y, por lo tanto, el destino de la célula. Las células pueden generar intrínsecamente fuerzas mecánicas en su entorno; por ejemplo, la contractilidad actina-miosina que conduce a la remodelación de la matriz. De igual manera, la fuerza mecánica puede provenir de fuentes extrínsecas, tales como fuerzas de tracción, compresión o esfuerzos cortantes. Ya sea en forma individual o colectiva, estas fuerzas mecánicas impactan y regulan el comportamiento celular; por ejemplo, en estudios recientes se muestra que la rigidez también desempeña un papel en la migración celular, la proliferación y la propagación. Se sabe que las células aisladas migran a regiones de diferente rigidez, comportamiento denominado *durotaxis*. El eje de migración depende del tipo de célula; se sabe que las CM migran a regiones de rigidez creciente; mientras que se ha demostrado que las líneas celulares de cáncer tienen una relación variable con la rigidez del sustrato.

Las fuerzas de tracción mediadas por células están influenciadas por la capacidad para deformar localmente sustratos rígidos, pero muestran que la rigidez de la matriz regula el destino celular de manera directa o indirecta. La arquitectura de la fibra también se ha destacado como un mecanismo para la transducción de la rigidez de la matriz: una menor rigidez de la fibra permite a las células reclutar fibras cercanas, y se correlaciona con una mayor proliferación y expansión celular.

Las células distinguen, traducen y transmiten señales mecánicas a través de vías de señalización bioquímica y mediadas por receptores mecanosensibles (como la proteína talina); alternatively, las interacciones célula-célula y célula-MEC se entrelazan con redes de adhesión y filamentos para transmitir fuerzas. Además, el reordenamiento del citoesqueleto debido a la rigidez del sustrato puede distorsionar la envoltura nuclear causando aplanamiento y extendiendo así los poros nucleares. Esto altera el posicionamiento cromosómico dentro del núcleo y modifica el acceso de los reguladores transcripcionales —como la proteína asociada al Yes (YAP) y el coactivador transcripcional

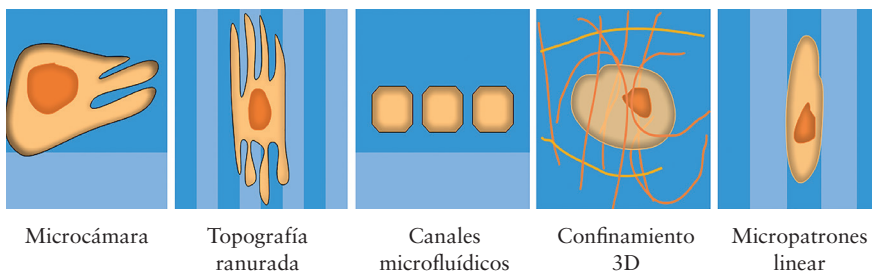
(TAZ)— a distintos sitios de cromatina; como por ejemplo, el aumento de la importación nuclear de YAP y una consiguiente alteración en el fenotipo celular (figura 4).

Otros factores fisicomecánicos que contribuyen a la regulación del destino celular son el confinamiento y las señales geométricas. Las CM en el cuerpo están confinadas por otras células o por componentes de la MEC, generando interacciones intercelulares, formación de fibras que estimulan la propagación y la migración celular y, finalmente, la inducción de variaciones conformacionales del citoesqueleto y el núcleo. Por consiguiente, el confinamiento da lugar a cambios marcados en estructura y en comportamiento celular (figura 4).

Además, el confinamiento se encuentra relacionado con las señales geométricas debido a que influye en la variación del fenotipo de las CM en cuanto a forma, tamaño y curvatura; por consiguiente, la geometría afecta el destino de las CM alterando la membrana plasmática por medio de diferentes vías de señalización. Al final, estudios demuestran que las señales geométricas también afectan la motilidad celular al alterar la formación de filamentos de actina, lamelipodios y filopodios (figura 5). Los mecanismos moleculares por los cuales las CM detectan y responden a las señales geométricas aún no se comprenden del todo.

Con respecto a la red de la proteína de actina celular en un cultivo, está organizada por una red contráctil de filamentos alineados

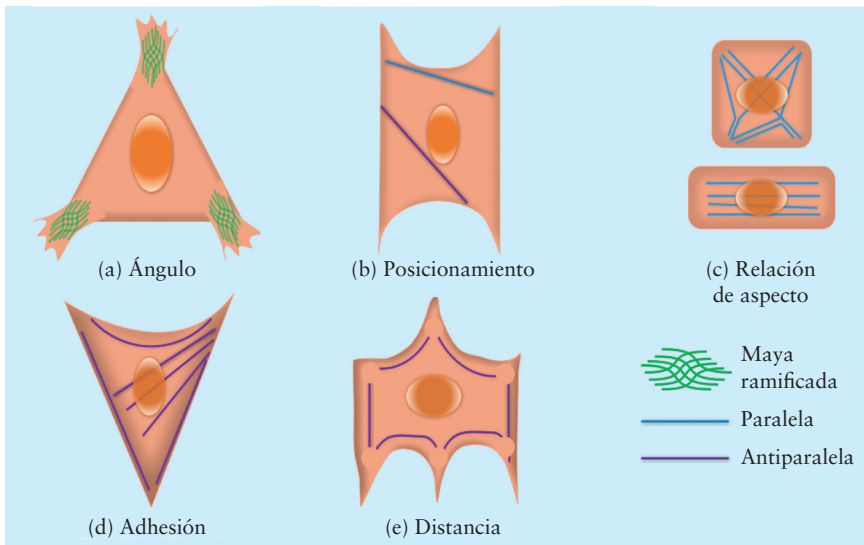
Figura 4. El efecto del confinamiento sobre el comportamiento celular. Esquema de modelos diseñados de microambientes de confinamiento que contribuyen a la regulación del destino celular:



Tomada y modificada de Bao, 2018.

y la polimerización de una malla ramificada no contráctil (figura 5). Este equilibrio parece estar regulado por el grado de adhesión celular. La malla ramificada se ensambla en la periferia de la célula, desarrollándose a lo largo de células convexas y promoviendo la deformación de membrana en el ápice celular (figura 5a). Los haces contráctiles antiparalelos se encuentran en todo el citoplasma. Los componentes de los paquetes periféricos se mueven hacia el centro del paquete, mientras que los componentes de los paquetes internos permanecen estáticos (figura 5b). A medida que aumenta la propagación celular, aumenta la contracción celular; por lo tanto, se induce la alineación de los haces contráctiles (figura 5c). Cuando la célula se extiende sobre una región adhesiva, se forman paquetes contráctiles que conectan esta región que muestran que existen fuerzas de tracción (figura 5d). Una distancia relativamente mayor entre los sitios de adhesión genera una curvatura reducida del borde que refleja una fuerza mayor (figura 5e).

Figura 5. El efecto de las señales geométricas sobre la organización de la actina. Imagen esquemática que muestra cómo la geometría dirige la organización del citoesqueleto, que influye en la variación del fenotipo de las CM en cuanto a forma, tamaño y curvatura:



Tomada y modificada de Bao, 2018.

Por otra parte, los cambios en la adhesión celular a los sustratos se pueden controlar mediante la manipulación de propiedades de los materiales, como la humectabilidad y la elasticidad de la superficie; esto se puede realizar empleando estrategias químicas para diseñar sustratos. De igual forma, el control de las propiedades de la superficie que influyen en la adsorción de proteínas puede mejorar y controlar las propiedades de la adhesión celular.

Por último, todas las propiedades descritas de la MEC son relevantes al momento de configurar modelos de cultivo *in vitro* —como microcámaras, sustratos ranurados, canales microfluídicos, sustratos impresos de microcontacto e hidrogeles 3D— debido a que los factores como la rigidez, el confinamiento, las señales geométricas, la degradabilidad y los receptores de superficie influyen de forma contundente en el destino de las CM.

Cultivando células madre

En investigación, existe la posibilidad de cultivar la mayoría de CM humanas, incluso las obtenidas a partir de modelos biológicos. En la actualidad, la investigación se basa principalmente en cuatro tipos: las CMA; dentro de estas, las CMM; las CMPi y las CME. Las CME se han visto bastante limitadas debido al uso de embriones como fuente de extracción, lo que representa un conflicto bioético; además, requieren un riguroso mantenimiento. Por estas razones, solo las CMA, las CMM y las CMPi serán tema central en esta sección.

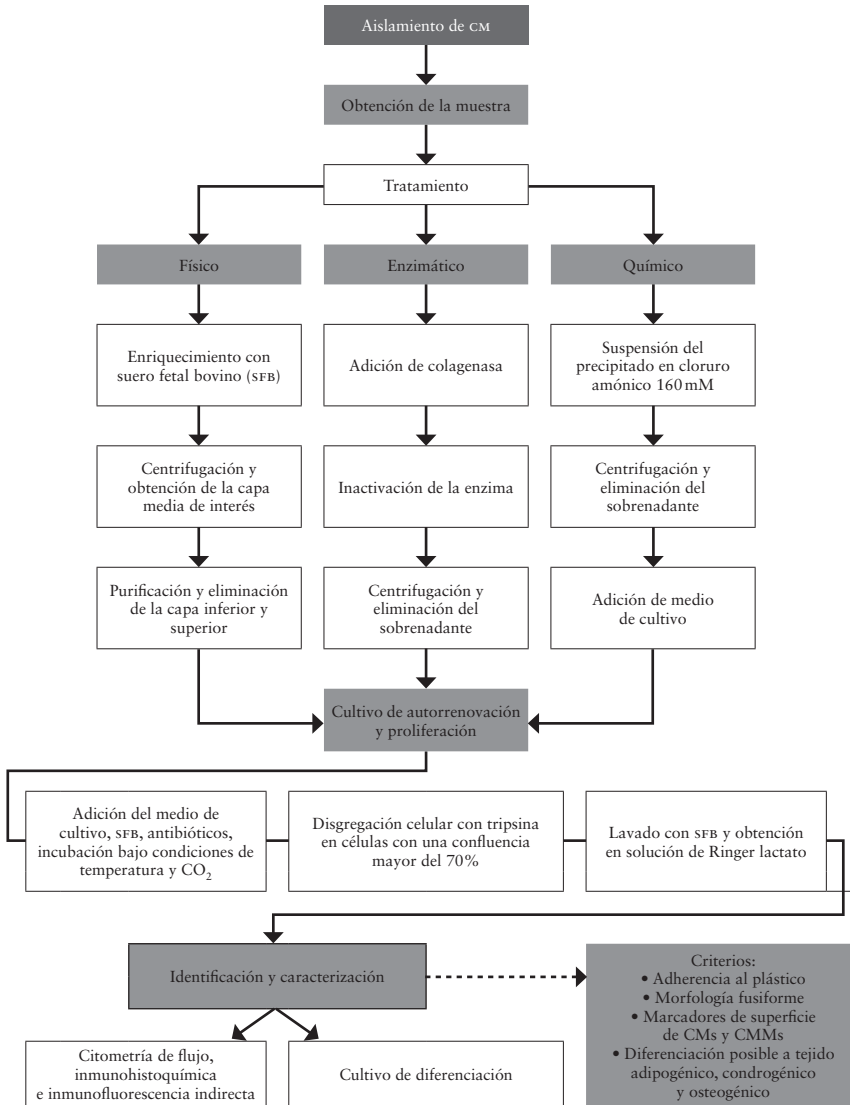
A nivel general, existen dos grandes objetivos respecto a los cultivos de CM. En primer lugar, el cultivo permite la autorrenovación y proliferación de células indiferenciadas para estudios específicos de acuerdo con las necesidades del laboratorio. En segunda instancia, mediante el ofrecimiento de condiciones específicas, el cultivo permite modular la diferenciación de las CM de acuerdo con los requerimientos.

Para cultivar células madre, primero se debe realizar un aislamiento por medio de diversos tratamientos —ya sean físicos, químicos y/o enzimáticos—, con el fin de obtener una muestra representativa que luego se cultivará en un medio para la proliferación o expansión celular (cultivo de autorrenovación). Después se realiza una caracterización

a través del cumplimiento de criterios de identificación (en el caso de CMM).

Finalmente, de acuerdo con los requerimientos del laboratorio, se emplean medios de inducción para la diferenciación celular (figura 6).

Figura 6. Flujograma del proceso de aislamiento y cultivo



Elaboración propia.

El mantenimiento de los cultivos de CM es mucho más riguroso comparado con el de líneas celulares convencionales. Si no se realiza un control adecuado del cultivo, las células se pueden diferenciar de forma indeseada; por ello es importante conocer las condiciones, suplementos y aditivos mínimos para un adecuado desarrollo celular.

Aislamiento de células madre

Cada tipo de CM tiene tejidos específicos para su obtención, y los métodos de aislamiento y cultivo se estandarizan dependiendo del tejido. Por ejemplo, el aislamiento de CMM puede realizarse a partir de médula ósea, cordón umbilical, líquido amniótico, membrana amniótica, tejidos dentales, endometrio, brote de la extremidad, sangre menstrual, sangre periférica, placenta, membrana fetal, glándula salival, piel y prepucio, membrana de revestimiento del cordón umbilical subamniótico, líquido sinovial, gelatina de Wharton, tejidos dentales (encía, pulpa, papila y folículo dental) y tejido adiposo; esta última es la fuente más abundante. En la tabla 1, se muestran las principales fuentes de CMM y el método de aislamiento.

Tabla 1. Principales fuentes de obtención de cmm y métodos de aislamiento

Fuente	Método de aislamiento
Médula ósea	Método de gradiente de densidad de Ficoll. Nuevo dispositivo de filtro de médula ósea
Tejido adiposo	Método de digestión Método de filtración por membrana
Líquido amniótico y membrana	Método de gradiente de densidad Método de digestión
Tejidos dentales	Método de digestión
Endometrio	Método de digestión
Brote de la extremidad	Método de digestión
Sangre periférica	Gradiente de densidad Ficoll
Placenta y membrana fetal	Método de digestión
Glándula salival	Método de digestión (solución de Ringer)

Continúa

Fuente	Método de aislamiento
Piel y prepucio	Método de digestión
Membrana de revestimiento del cordón umbilical subamniótico	Método de digestión
Líquido sinovial	Método de gradiente de densidad Ficoll

Tomada y modificada de Ullah, 2015.

CMM a partir de cordón umbilical. El cordón umbilical tiene gran relevancia como fuente de CMM debido a que su obtención no requiere procedimientos invasivos, ya que es considerado un producto de desecho, y no genera problemas bioéticos y normativos. El aislamiento de CM es de baja complejidad y el riesgo de contaminación es mínimo. A nivel mundial, se han creado biobancos de cordón umbilical con el fin de que las células aisladas puedan tener un uso clínico terapéutico y en investigación. Cabe aclarar que, en la actualidad, el uso de la sangre proveniente de cordón umbilical se utiliza como fuente de precursores hematopoyéticos, que luego son trasplantados a pacientes compatibles.

Para el aislamiento de células, en primer lugar se recoge el cordón umbilical en condiciones de esterilidad, en un plazo máximo de 24 horas después del nacimiento del niño; es el tiempo estimado en el que no se alteran las características físicas y funcionales. Al llegar la muestra al laboratorio, es recomendable mantenerla en tampón fosfato salino (PBS) a 4 °C hasta su posterior procesamiento.

Después se realiza un lavado con PBS para eliminar restos sanguíneos. La muestra se corta de forma transversal (0.5-1 cm) y los fragmentos se someten a tratamiento enzimático (3 h a 37 °C) con la combinación de la enzima colagenasa con hialuronidasa o tripsina. Este paso debe realizarse manteniendo una agitación constante durante el tiempo estipulado. A continuación, el tejido sobrante se elimina mediante filtración usando filtro de 100 µm y se determina la viabilidad celular a través de un recuento en cámara de Neubauer. La suspensión celular se realiza en medio de cultivo DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) más antibióticos, y se incuba a 37 °C con 5 % de CO₂. Después de dos días de incubación, se observan al microscopio invertido células adherentes que proliferan

hasta alcanzar la confluencia y se reemplaza el medio de cultivo. Al alcanzar una confluencia cercana al 80 %, se tratan las células con tripsina para disgregarlas del frasco de cultivo. Se verifica la viabilidad y se hace un ajuste de densidad celular con el fin de realizar nuevo cultivo para expandir las células. La identificación celular se realiza luego, determinando los antígenos de superficie característicos. Por último, se realiza la diferenciación celular según lo estipulado en los criterios de comprobación de CMM.

CMM de pulpa dental. Para el cultivo de CMM se siembran los explantes de origen dental en placas con medio de cultivo, SFB y antibiótico, y control de temperatura y de porcentaje de CO₂. A los 10 días, se cambia el medio y se elimina el explante. Cerca de las cuatro semanas de incubación, se observan células con fenotipo fibroblastoide adheridas al plástico, las cuales se resuspenden en medio de cultivo.

Luego se realiza el recuento en cámara de Neubauer y se vuelven a cultivar durante tres semanas hasta que las células alcancen un grado de confluencia del 80 % para posterior disgregación con tripsina. Este paso es seguido por un lavado con solución fosfatada y tamponada. Para finalizar, las células se centrifugan; este se constituiría en el pase número 1. Es aconsejable que antes de la identificación y caracterización se realicen aproximadamente cuatro pases.

CMM de tejido adiposo. Para el aislamiento de CMM de tejido adiposo del abdomen, el paso inicial es la extracción de la muestra, por ejemplo, a partir de un lipoaspirado obtenido bajo adecuadas condiciones de extracción. Cuando la muestra llega al laboratorio, debe realizarse el tratamiento físico: la muestra se enriquece con SFB y enseguida se centrifuga para permitir la diferenciación de tres capas:

- *Inferior*: sustancias y aditivos recolectados durante la extracción, células sanguíneas. Esta capa se retira por medio de drenaje gravitacional.
- *Superior*: triglicéridos, ácidos grasos libres y adipocitos rotos. Esta capa se retira por capilaridad.
- *Media*: es la de interés; aloja CMM, además del parénquima de adipocitos, la MEC de tejido fibroso y vasos sanguíneos. En conjunto se denomina fracción vascular estromal (FVE) y tejido adiposo purificado.

Cuando se han eliminado las capas inferior y superior, y se tiene únicamente la capa media, se inicia el proceso de purificación mediante tratamiento enzimático, exponiendo la MEC a la enzima colagenasa. Para la inactivación de la enzima, se agrega medio de cultivo en una proporción igual a la cantidad adicionada de colagenasa; enseguida, se centrifuga y se desecha el sobrenadante que contiene grasas indeseables. El precipitado se constituye en el material de interés. Con el objeto de finalizar la purificación y lisar los restos de eritrocitos, se realiza un tratamiento químico, donde el precipitado se resuspende en cloruro amónico 160 mM (NH_4Cl), se centrifuga, se desecha el sobrenadante y, por último, se adiciona medio de cultivo.

Caracterización e identificación de células madre

Una vez las células se han aislado en cultivo, es necesario realizar una caracterización e identificación mediante técnicas de citometría de flujo, inmunofluorescencia indirecta e inmunohistoquímica. Según la International Society of Cellular Therapy (ISCT), existen unos criterios de comprobación de CMM:

1. Adherencia al plástico en 24 horas bajo condiciones estándar de cultivo.
2. Morfología fusiforme o fibroblastoide a las 30 horas (análoga a fibroblasto).
3. Verificación de la expresión de más de 95 % de marcadores o antígenos de superficie de CMA y CMM mediante citometría de flujo (tabla 2).
4. Diferenciación posible a tejido adipogénico, condrogénico y osteogénico.

Tabla 2. Marcadores de superficie celular de acuerdo con la fuente de extracción.

Principales tejidos empleados como fuentes de obtención de CMM y los marcadores de superficie que deben ser positivos o negativos.

Fuente	Marcadores de superficie celular	
	Positivo	Negativo
Médula ósea	CD73, CD90, CD105, STRO-1	CD14, CD34, CD45, HLA-DR
Tejido adiposo	CD73, CD090, CD29, CD44, CD71, CD105, CD13, CD166, STRO-1	CD14, CD31, CD34, CD45
Líquido amniótico y membrana	CD29, CD44, CD90, CD105, CD, SH2, SH3, HLA-DR	CD10, CD14, CD34, HLA-DR
Tejidos dentales	CD29, CD44, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45
Endometrio	CD73, CD90, CD105, CD146	CD34, CD45
Brote de la extremidad	CD13, CD29, CD90, CD105, CD106	CD3, CD4, CD14, CD15, CD34, CD45, HLA-DR
Sangre periférica	CD44, CD90, CD105, HLA-ABC	CD45, CD133
Placenta y membrana fetal	CD29, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45
Glándula salival	CD13, CD29, CD44, CD90, STRO-1	CD34, CD45
Piel y prepucio	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, SSEA-4, vimentina	CD34, CD45, HLA-DR
Membrana de revestimiento del cordón umbilical subamniótico	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45
Líquido sinovial	CD44, CD90, CD105, CD147, STRO-1	CD31, CD34, CD45, CD106
Gelatina de Wharton	CD73, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45, CD79, HLA-DR

Tomada y modificada de Ullah, 2015.

Autorrenovación y proliferación de células madre indiferenciadas

Después de un correcto aislamiento, purificación y caracterización, se realiza un cultivo de autorrenovación y proliferación mediante la adición, como mínimo, de medio de cultivo, SFB, antibióticos, en las condiciones de temperatura y porcentaje de CO₂. Al observar al microscopio, inicialmente se observan células fusiformes y detritos celulares. A las 24 horas, se eliminan los detritos mediante lavado con SFB, y las células fijas de la placa se mantienen bajo las mismas condiciones iniciales de incubación. Luego de 5 a 7 días de incubación, las células alcanzan una confluencia cercana al 70 % y se procede a realizar una incubación con tripsina para disgregar las CMM. Las células se lavan con SFB y se recogen en solución de lactato de Ringer, con el fin de proceder a la identificación y caracterización celular.

Los medios de cultivo convencionales empleados para cultivar células madre son los medios basales definidos como DMEM o MEM (medio esencial mínimo). Estos medios deben complementarse con aditivos como proteínas que medien la adhesión a los plásticos (integrinas), lípidos para fines anabólicos celulares, factores de crecimiento, y hormonas que direccionen la autorrenovación y la proliferación de las CM. Un ejemplo de mecanismos que regulan y promueven la autorrenovación son los factores Notch, Shh (Sonic hedgehog) y Wnt. En la actualidad, se habla de medios de cultivo químicamente definidos, cuyo diseño incorpora proteínas de MEC y factores de crecimiento que ofrecen condiciones de cultivo *in vitro* para la proliferación y renovación de CM (tabla 3).

Algunos cultivos requieren de una matriz que servirá de soporte para las células; uno muy común es la capa de fibroblastos mitóticamente inactivos o células alimentadoras aisladas de ratón (CAR), que permite mantener la indiferenciación, pluripotencia, crecimiento y expansión celular, gracias a la secreción de factores de crecimiento y citocinas. Hay estudios que reportan que el uso de CAR puede transmitir agentes infecciosos zoonóticos capaces de infectar las CM durante el cultivo *in vitro*. Por ello, se ha desarrollado y probado el uso de células alimentadoras humanas, como células de la trompa de Falopio,

Tabla 3. Medios de expansión y suplementos de suero respecto a la fuente de obtención. Se relacionan los principales tejidos empleados como fuentes de obtención de CMM, medios y suplementos de sueros adecuados para la expansión de CMM.

Fuente	Medios de expansión	Suplemento de suero
Médula ósea	DMEM DMEM-F12 de Ham Advanced DMEM (ADMEM)	SFB
Tejido adiposo	DMEM DMEM low glucose (DMEM-LG)	SFB-STF
Líquido amniótico y membrana	α -MEM DMEM-F12 de Ham	SFB
Tejidos dentales	α -MEM-MEM	SFB-STF
Endometrio	DMEM-F12 de Ham	STF
Brote de la extremidad	DMEM-LG	SFB
Sangre periférica	MEM- α modification (α -MEM)	SBRN
Placenta y membrana fetal	DMEM-LG	SFB
Glándula salival	DMEM	STF
Piel y prepucio	DMEM High Glucose (DMEM-HG) DMEM DMEM-F12 de Ham	SFB
Membrana de revestimiento del cordón umbilical subamniótico	DMEM-HG DMEM CMRL1660	SFB
Líquido sinovial	α -MEM	SFB
Gelatina de Wharton	DMEM	SFB

SFB: suero fetal bovino; DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco;
MEM: medio esencial mínimo; SBRN: suero de becerro recién nacido;
STF: suero fetal de ternero.

Tomada y modificada de Ullah, 2015.

prepucio fetal, músculo, piel del feto, células estromales del hígado fetal transgénico, médula ósea, células placentarias, células endometriales y células estromales umbilicales; estas últimas ofrecen una mejor fuente de células alimentadoras y se pueden recolectar utilizando métodos no invasivos. Se ha reportado que las células alimentadoras humanas

secretan, de manera adicional, factores de crecimiento (como el TGF- β y la activina A) que están involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia; entre las desventajas se cuentan: el mantenimiento de las capas de alimentación y la variación entre las poblaciones de células alimentadoras, que afecta de forma negativa la producción de CM.

El SFB es considerado un suplemento importante para la proliferación de CM. Ofrece factores de crecimiento, proteínas, minerales, portadores de nutrientes insolubles en agua, inhibidores de proteasas y viscosidad; además, regula el pH y se une a sustancias tóxicas neutralizándolas. Debido a que es un derivado de origen animal, existe la posibilidad de contaminación con agentes virales, zoonóticos y priones. Como solución a estos inconvenientes, se han establecido alternativas como el uso de medios derivados de sangre humana (como el suero y el derivado de plaquetas); sin embargo, su obtención, procesamiento e implementación representan altos costos, y aún no existen métodos que garanticen altas cantidades; además, se debe considerar la existencia de riesgo de presencia de patógenos humanos y agentes que afecten la calidad de las CM.

A pesar de las desventajas de la adición de suero —como la alta variabilidad de cada lote; la posible contaminación con priones, agentes virales y zoonóticos; la difícil aprobación del producto y el desencadenamiento de reacciones inmunológicas—, la mayoría de los medios de cultivo de CM contienen entre 10 % y 20 % (vol/vol) de SFB; y, de igual forma, la mayor parte de cultivos de CM se expanden utilizando SFB como suplemento para el medio de cultivo. Sin embargo, para evitar el riesgo de transmisión de agentes infecciosos xenogénicos e inmunización, la comunidad científica propone alternativas como el uso de suero humano, de plasma rico en plaquetas o de lisado de plaquetas.

Cabe mencionar otros aditivos y condiciones, como el uso de antibióticos (como penicilina, estreptomycin o gentamicina) para evitar la contaminación con microorganismos. Las condiciones de CO₂ y las temperaturas similares a las proporcionadas *in vivo* para un crecimiento idóneo son 37 °C con 5 % de CO₂ y 20 % de O₂. Y, por otra parte, la adición de aminoácidos no esenciales.

Es importante resaltar que se debe prestar atención a la posible aparición de sustancias extraíbles y lixiviables, sustancias químicas

que migran de la capa de contacto plástica al medio de cultivo con células, todo lo cual puede reducir el crecimiento celular e incluso conducir a la muerte celular.

Diferenciación de células madre

Para la diferenciación celular se utilizan medios de cultivo de inducción, que son medios convencionales modificados al adicionar factores de crecimiento y hormonas; un ejemplo es el TGF- β (factor transformante de crecimiento β -relacionado). El cultivo para inducir la diferenciación se relaciona con el linaje (ectodermo, mesodermo y endodermo) que se desee modular.

En el caso de CMM, por ejemplo, a partir del pase 4 y con una confluencia cercana al 80 %, se realiza un cultivo en una densidad celular específica según el linaje y bajo condiciones estándar; al alcanzar el 100 % de confluencia, se añaden los suplementos y aditivos expuestos en la tabla 4.

Tabla 4. Suplementos y aditivos añadidos de acuerdo con la diferenciación de CMM

Suplementos y aditivos	Diferenciación osteogénica	Diferenciación condrogénica	Diferenciación adipogénica
Medio de diferenciación	X	X	X
Antibióticos	X	X	X
Dexametasona 0.1 mM	X	X	X
β -glicerofosfato 10 mM	X	X	
Ascorbato-2 fosfato	X	X	
Insulina		X	X
TGF- β 1		X	
Ácido linoleico, ácido selenioso y piruvato		X	
Indometacina			X
Isobutil metilxantina			X

Elaboración propia.

Factores como el TGF- β 1 y el ascorbato-2-fosfato se adicionan día de por medio durante todo el proceso de diferenciación. Se mantiene la incubación bajo condiciones estándar. Luego de dos semanas de incubación, se verifica al microscopio la presencia de cúmulos de minerales, cristales birrefringentes y micromasas celulares, y se detiene la diferenciación. Las CMM se lavan con PBS y se tiñen con:

- Solución *alizarin red* 40 mM en NaH_2PO_4 0.1 M a pH 4,3; permite la identificación osteogénica y tiene afinidad por tejidos mineralizados.
- Safranina O; permite la identificación condrogénica; se une a los grupos carboxilo y sulfato de los glicosaminoglicanos (GAG), que abundan en la MEC del cartílago.
- Solución saturada de *Oil red* en isopropanol 60 %; permite la identificación adipogénica y tiene afinidad por los lípidos.

Las células se lavan con PBS, se fijan con etanol y de nuevo se lavan con PBS. La cantidad de lavados y las fijaciones se estandarizan según el linaje celular. Por último, se realiza la identificación y caracterización visual al microscopio.

Diferenciación de CMM en osteocitos. En principio se observa una agregación mineral; y en la última semana de diferenciación, se incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina. El proceso de osteogénesis comienza con un osteoprogenitor, que pronto se diferencia en preosteocito y luego en osteoblasto maduro; este último se encarga de la síntesis de la matriz ósea, la remodelación y la deposición de minerales. Durante el proceso, se secretan factores, proteínas y moléculas; entre estos, el factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2), la osteonectina, la proteína morfogénica ósea BMP2 y las moléculas de señal extracelular.

Diferenciación de CMM en condrocitos. Para la formación de cartílago, durante la preinducción tiene lugar la formación de condrocitos que expresan colágenos de tipo I y tipo II; al final, los condrocitos maduran y expresan FT condrogénicos, como Sox9, L-Sox5 y Sox6.

Diferenciación de CMM en adipocitos. Se induce por medio de la activación de los FT responsables de la adipogénesis, activación que se desarrolla en dos fases: fase de determinación, en la que los

preadipocitos muestran una morfología fibroblastoide y no pueden diferenciarse de sus precursores; y fase de diferenciación terminal, en la que los preadipocitos se transforman en adipocitos maduros, y secretan lípidos y expresan proteínas específicas de los adipocitos.

Las CMM también tienen el potencial para diferenciarse en cardiomiocitos, células neuronales (oligodendrocitos, neuronas colinérgicas y dopaminérgicas), pancreocitos y hepatocitos. Para alcanzar una etapa de diferenciación en hepatocitos, se cultiva en medio de cultivo suplementado con EGF (factor de crecimiento epidérmico), bFGF y nicotinamida durante una semana. Luego, en la etapa de maduración, las células se cultivan con la premezcla de oncostatina M, dexametasona e ITS (insulina, transferrina, selenio), dando lugar a hepatocitos maduros que expresan marcadores de transcripción específicos del hígado, como la albúmina, la fetoproteína α y el factor nuclear 4α del hepatocito (HNF-4 α).

Criopreservación de células madre

El almacenamiento criogénico puede preservar durante décadas la viabilidad de células, incluso tan frágiles como las CMH. Los productos basados en CM pueden fabricarse por adelantado y recuperarse del almacenamiento para uso clínico o investigación cuando sea necesario. La estabilidad celular durante la criopreservación depende de la tasa de congelación, la forma de aplicación y la concentración del crioprotector; cuando se observan problemas de estabilidad celular, se deben examinar las concentraciones del crioprotector y la temperatura, teniendo en cuenta que a temperaturas elevadas ocurren eventos no deseados.

Para criopreservar las CM en laboratorio —es decir, para interrumpir el metabolismo celular sin que se alteren sus funciones biológicas y estructurales—, estas se llevan a nitrógeno líquido a una temperatura aproximada de -196°C . Esto se hace con el objetivo de preservar las células alogénicas para trasplante o estudios clínicos posteriores y realizar las respectivas pruebas de tamizaje de enfermedades infecciosas y pruebas de histocompatibilidad.

El proceso de criopreservación evita el daño de las membranas celulares; para ello se emplean crioprotectores, como el dimetilsulfóxido

(DMSO) que es considerado la opción estándar. Cuando la suspensión de células es congelada, se forman cristales de hielo que pueden perforar la membrana celular, lo que conlleva muerte de las células. El efecto crioprotector del DMSO consiste en interferir en la formación de cristales de hielo y solubilizar la membrana celular, evitando que sea perforada. Sin embargo, el DMSO muestra toxicidad, ya que en aplicaciones clínicas en pacientes se ha asociado con náuseas, vómito, dolor de cabeza, hipertensión, diarrea e hipotensión; y también se han informado efectos graves, como problemas cardiovasculares y respiratorios. Debido a estos efectos, es necesario lavar con soluciones isotónicas antes del trasplante o remplazar el DMSO. Hay en estudio un nuevo método que utiliza la mezcla de glucosa 0.05 M, sacarosa 0.05 M y etilenglicol 1.5 M en solución salina tamponada con fosfato, y muestra resultados exitosos respecto al aislamiento y caracterización de CMM después de tres meses de crioconservación; pero aún no ha sido empleado para crioconservación de células de uso clínico.

Otro factor importante lo constituye el medio de crioconservación óptimo en el cual las CM mantienen sus propiedades a lo largo del tiempo. Uno de los requerimientos es el SFB, el cual provee nutrientes; sin embargo, los estudios sugieren que las proteínas SFB (que son de origen animal) son adquiridas por las CM y en usos clínicos pueden generar eventos adversos en los pacientes trasplantados. Por consiguiente, se han adelantado estudios empleando medios sin suero, por ejemplo, usando albúmina humana y neuropéptido, en donde las CMM mantienen su potencial de supervivencia y proliferación celular.

Es relevante la tasa de temperatura de congelación, que puede hacerse por congelación de velocidad controlada o por congelación programable lenta. La congelación lenta a una tasa de 1 °C/min es la óptima para la conservación de CM. Para alcanzarla, se emplean congeladores de velocidad controlada (CVC), que son programables y permiten supervisar la temperatura exacta de la muestra durante la congelación. A pesar de sus numerosos beneficios, los CVC no ofrecen uniformidad en la temperatura de todo los crioviales cuando se realizan operaciones a gran escala. En la actualidad, los CVC para bancos de CM se han mejorado, ya que proporcionan un flujo unidireccional de criógeno a cada muestra, lo cual hace más segura y efectiva la crioconservación.

Las instituciones que regulan la reglamentación frente a la crioconservación son la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en Estados Unidos y la Agencia Europea de Medicamentos en Europa.

Es recomendable almacenar las CM en la fase de nitrógeno líquido, pero la fase de vapor es usada con frecuencia, ya que evita la contaminación cruzada. A pesar de que garantiza un adecuado almacenamiento, la fase de vapor es susceptible de ocasionar calentamientos accidentales que comprometen la calidad del producto.

Control de calidad de cultivos de células madre

Los ensayos para evaluar la calidad y seguridad de las CM incluyen: morfología, características de crecimiento, esterilidad, cariotipo y pruebas de eficacia. Para evaluar la identidad de las CM, se deben seguir los criterios mínimos propuestos por la International Society for Cellular Therapy (que es la sociedad internacional de terapia celular), y estos incluyen: adherencia al plástico, expresión de un antígeno de superficie específico y diferenciación. El perfil fenotípico de las CM se considera un criterio de liberación; por esta razón, se deben realizar controles para garantizar la validez de los resultados. En cuanto a la morfología, un cambio drástico podría afectar la respuesta y el compromiso de las CM. De modo similar, el crecimiento celular debe controlarse en cada paso y expresarse en términos de duplicaciones de la población (DP). La viabilidad se debe mantener en un valor mayor del 90 % y se puede evaluar utilizando el método de exclusión con azul de tripano o con citometría de flujo, utilizando yoduro de propidio. Idealmente, la expansión celular no debe exceder las veinte duplicaciones de población para evitar el proceso de senescencia.

Una vez que las CM necesitan expandirse *in vitro* durante un período prolongado de tiempo, el mantenimiento de la estabilidad genómica debe garantizarse mediante análisis del cariotipo, hibridación genómica comparativa (CGH) o hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Por esta razón, se ha propuesto que las condiciones del cultivo sean elegidas de manera cuidadosa para evitar una alta tasa de proliferación; y el número de duplicaciones de la población debería reducirse al mínimo, para evitar anomalías cromosómicas. También se

debe realizar un cariotipo convencional, para evaluar las aberraciones cromosómicas en los cultivos de CM. De igual manera, hay que evaluar el riesgo de contaminación, que podría afectar la eficacia, seguridad y calidad de las CM. Es preciso documentar y evaluar la contaminación por bacterias, hongos, micoplasmas y endotoxinas bacterianas. Estas pruebas deben realizarse no solo en el producto celular final, sino también en todo el proceso de fabricación, en los reactivos y en los insumos.

Nuevas tecnologías de cultivo para modular la diferenciación de células madre

En cuanto a la clasificación de los cultivos de células madre, se cuenta con cultivos en monocapa, que representan la técnica tradicional y generalizada para la expansión de CM debido a su simplicidad, bajo costo y fácil manejo. Este tipo de cultivo consiste en un compartimento único, en donde los nutrientes se difunden a las células y el intercambio de gases (CO_2 y O_2) ocurre solo en la interfaz medio/gas (figura 7).

Con el fin de incrementar la producción celular, se han implementado cultivos en multicapas, que ofrecen una mayor superficie de crecimiento celular al aumentar el número de matrices, lo cual resulta

Figura 7. Representación esquemática de sistemas de cultivo en monocapa. Frascos de cultivo, placas multipocillos y cajas de Petri poseen un compartimento único en donde los nutrientes se difunden a las células y el intercambio de gases (CO_2 y O_2) ocurre solo en el interfaz medio/gas.



Tomada y modificada de Mizukami, 2018.

de utilidad en investigación. En la actualidad, existen a nivel mundial fabricantes de multicapas que ofrecen productos para cultivo de células de marcas como Nunc y Corning. Es importante resaltar que las multicapas también necesitan un equipo manipulador automático de fábrica de células (ACFM) y una incubadora de piso grande.

A pesar de la efectividad de la expansión de CM en monocapa, se han observado diversas limitaciones, como el riesgo de contaminación (que afecta las propiedades funcionales y fisiológicas de las células) en la manipulación por parte de un operador externo que realiza sucesivos pases por medio de tratamientos enzimáticos. Además, la falta de control de los parámetros de cultivo, como los gradientes de concentración (pH, oxígeno disuelto, nutrientes y metabolitos), conduce a un microambiente heterogéneo que genera costos elevados y cultivos prolongados para la producción idónea de células. En pruebas de investigación, el contacto lateral, la falta de difusión de nutrientes o de oxígeno y eliminación de residuos pueden afectar la morfología, la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular.

Con el fin de contrarrestar las limitaciones de los cultivos en monocapa, se han establecido configuraciones en 2D y 3D a través de los biomateriales (superficies, andamios para ingeniería de tejidos), la biofabricación (microfluidos, bioimpresión tridimensional) y el biorreactor (entorno fisiológico), que permiten imitar mejor los microambientes celulares además de facilitar la construcción e investigación de sus componentes. Los avances han permitido emplear tecnologías no animales de alto rendimiento, que reducen la experimentación animal costosa e ineficiente y permiten recrear tejidos complejos. Sin embargo, las metas pensadas a futuro están en el diseño de microambientes que resulten útiles en ámbitos como la medicina regenerativa y los descubrimientos terapéuticos.

Cultivo de células madre en 2D

Los cultivos 2D constan de CM colocadas directamente sobre un sustrato rígido (como poliestireno o vidrio). Por lo general, se recubren con sustratos que imitan la composición de la MEC, promueven la adhesión celular y pueden soportar el comportamiento celular deseado,

como la proliferación o diferenciación. Entre otros, la laminina, la poliornitina, la polilisina y la fibronectina son sustratos de recubrimiento estándar para el cultivo celular; fomentan la adhesión celular a través de los receptores de integrina, contribuyen a la diferenciación y facilitan la unión celular debido a la atracción electrostática con la superficie celular.

El cultivo 2D se caracteriza por ser reproducible, pero no imita la complejidad del tejido *in vivo* y limita la interacción célula-célula. Existen limitaciones en los modelos de cultivo 2D que no representan con gran eficiencia un microentorno natural, ya que las células crecen de forma homogénea y adheridas a un sustrato que imita la MEC. De igual forma, no se crean señales ambientales, biofísicas o bioquímicas, que generan impacto en las actividades y funcionalidades celulares. Además, el cultivo 2D no imita la complejidad del microambiente natural ya que solo dispone de una población única de células, lo cual lo hace inadecuado para el modelado de enfermedades y la comprensión de mecanismos fisiopatológicos.

Como ya se describió antes, las características de la superficie influyen en la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y los comportamientos de migración celular. Los cultivos 2D, al ser estáticos y proveer un solo tipo de sustrato, no permiten el desarrollo natural de las células; esto se ha observado en la variación de los perfiles de expresión de genes y proteínas en las células cultivadas en configuración 2D en comparación con los modelos 3D (tabla 5). De esta manera, los avances científicos son obstaculizados potencialmente en los modelos 2D.

Modelos de cultivo 3D

Los cultivos 3D son sistemas basados en técnicas sin andamios y en técnicas con andamios. Las técnicas sin andamios pueden generarse cultivando células en agrupaciones esféricas autoensambladas en 3D, a veces denominadas *agregados celulares* o *esferoides*, que no contienen biomateriales agregados y la MEC presente es producida solo por las mismas células replicando en forma similar un microambiente *in vivo*.

Por otro lado, las técnicas basadas en andamios pueden obtenerse sembrando células en matrices 3D sólidas o líquidas, hechas

de materiales naturales o sintéticos, que proporcionan la interacción célula-matriz y guían el comportamiento celular, gracias a que facilitan la transmisión de señales físicas y químicas apropiadas para la adhesión, proliferación, diferenciación, supervivencia celular y comunicación intercelular.

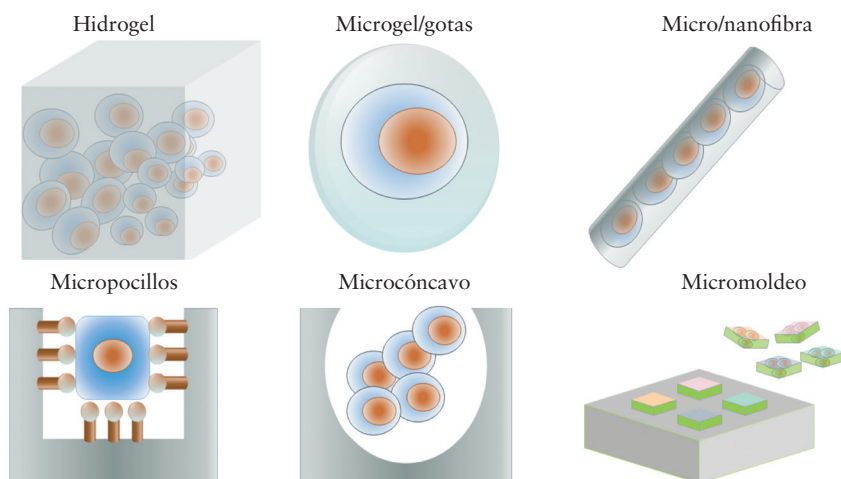
De las matrices 3D empleadas se destaca la permeabilidad de metabolitos, la conductancia eléctrica, la rentabilidad, la fácil manipulación, la reproducibilidad y una fácil recolección de productos de desecho, que finalmente facilitarían la angiogénesis y una mayor tolerancia inmunológica en futuros trasplantes.

En la actualidad, se han desarrollado tecnologías para la fabricación y diseño de matrices sofisticadas entre las cuales se destacan: la tecnología basada en hidrogeles, micropocillos y microgel (figura 8).

Hidrogeles: son sistemas poliméricos entrecruzados en agua, que se pueden fabricar a partir de una variedad de biomateriales naturales, como colágeno, fibrina o ácido; así como de materiales derivados de otras fuentes biológicas, como quitosano, alginato, gelatina, agarosa o dextrano. Estos últimos biomateriales presentan una mayor biocompatibilidad y bioactividad, ya que tienen sitios de unión para las células, lo que da lugar a diversas interacciones que permiten mejorar la viabilidad, la proliferación, la migración celular, la diferenciación y la remodelación de la matriz del gel. Sin embargo, presentan limitaciones, ya que no están caracterizados los componentes específicos de los hidrogeles, los cuales podrían inducir señales que alteren la función celular de forma indeseada. Además, el ajuste y control de las propiedades físicas, químicas y el tamaño de las células individuales muestra una alta complejidad, lo que resulta inadecuado para hacer comparaciones directas con los resultados en sustratos 2D.

Los hidrogeles fabricados a partir de polímeros sintéticos, como el polietilenglicol (PEG), presentan características físicas, mecánicas y químicas que se pueden regular con facilidad, además de ofrecer una alta reproducibilidad. Permiten cultivos celulares a largo plazo, incluso cuando no hay ligandos de unión a integrina. Sin embargo, el comportamiento celular se ve afectado debido a la carencia de factores endógenos.

Figura 8. Vista general esquemática de los principales métodos utilizados para lograr el cultivo de células en 3D



Tomada y modificada de Bao, 2018.

La MEC se constituye en un sistema altamente dinámico. Hoy en día, para lograr una imitación similar a los microambientes nativos, se han desarrollado hidrogeles que permiten cambiar sus propiedades físicas y químicas por medio de estímulos externos; por ejemplo, hay hidrogeles termosensibles que con las variaciones de temperatura pueden endurecerse y ablandarse en forma reversible, permitiendo el estudio del efecto de la mecánica (cambios de rigidez) sobre el destino celular (mecanobiología).

Micropocillos: constituyen una plataforma simple de amplia utilización en la que se facilita el diseño estructural del microambiente de células 3D; pueden producirse a través de grabado directo en silicio, por fotolitografía o por moldeo de materiales de hidrogel usando litografía suave.

Las CM se pueden cultivar en micropocillos donde forman esferoides celulares muy eficientes, útiles en ingeniería de tejidos, investigación de toxicología de fármacos y modelos de invasión del cáncer. Los micropocillos proveen la posibilidad de regular en conjunto la densidad celular, la porosidad, la rigidez, la mecánica, la geometría, el confinamiento celular y la concentración de componentes de MEC. Como

limitación de los micropocillos, se argumenta que son sistemas inmóviles que impiden una adecuada manipulación de las CM, por lo cual son considerados por algunos investigadores como modelos pseudo-3D, que en realidad no pueden imitar el entorno 3D *in vivo*.

Existen micropocillos con geometrías dinámicamente ajustables, diseñados a partir de polímeros biocompatibles termosensibles, como la policaprolactona (PLC), con el fin de direccionar el destino celular a través de los cambios en la arquitectura del citoesqueleto. También se han descrito *arrays* de micropocillos celulares, útiles en el estudio específico de las señales de múltiples componentes que regulan la función celular, que se pueden utilizar para crear matrices de micropartículas a gran escala.

Microgeles: proporcionan un microentorno 3D para el cultivo de CM individuales encapsuladas con diferentes formas y tamaños utilizando diferentes métodos. Los microgeles son empleados en medicina regenerativa, y en el diseño de órganos o tejidos con morfologías específicas que consisten en bloques de construcción repetitivos, como los lóbulos hepáticos y la arquitectura de nefronas.

Tabla 5. Resumen comparativo de métodos 2D y 3D: ventajas y desventajas

	2D	3D
Técnicas	Las células se cultivan en superficies planas y adherentes, por lo general de plástico o vidrio, y se recubren con sustratos (laminina) para mejorar la adhesión celular y/o la diferenciación directa.	Sistemas basados en andamios, en una matriz sólida o líquida de material natural o sintético. Las células generalmente se siembran sobre materiales de andamio. Los sistemas libres de andamios, por ejemplo, esferoides autoensamblados, organoides o agregados celulares.
Ventajas	Simplicidad de uso. Por ejemplo, para usuarios con menos experiencia. Por lo general, no requiere equipo especializado. Cultivo homogéneo. Económico. Reproducible. Técnica bien establecida.	Permite interacciones más complejas entre las células y la interacción célula-MEC. Puede proporcionar una mejor organización espacial. Mayor grado de complejidad para modelos más relevantes de ambientes y tejidos <i>in vivo</i> .

Continúa

2D		3D
Ventajas	Facilidad de acceso a las células para aplicaciones posteriores y para técnicas de visualización (por ejemplo, microscopía).	Los sistemas basados en andamios pueden diseñarse para proporcionar señales químicas y físicas específicas. Por ejemplo, funcionalización, cambios en tamaño de poro y rigidez.
Desventajas	No es una buena representación del entorno fisiológico <i>in vivo</i>. Interacción célula-célula limitada en gran medida al contacto lado a lado. Falta de capacidad predictiva para eventos <i>in vivo</i>. Falta de interacciones celulares-MEC relevantes.	Puede ser costoso en comparación con 2D. Puede presentar un mayor desafío para las técnicas de visualización, microscopía y otras metodologías paralelas. Puede ser un desafío para la distribución homogénea de componentes (oxígeno y nutrientes), lo que lleva a áreas necróticas, muerte celular o heterogeneidad. Puede requerir equipo especializado y costoso (por ejemplo, biorreactores), y manejo y optimización por parte de expertos. Potencial de reproducibilidad reducido, incluida la variabilidad de materiales de andamios naturales. Los enfoques basados en andamios deben tener en cuenta las propiedades del material (por ejemplo, biodegradabilidad, tamaño de poro, composición química). Las plataformas basadas en andamios pueden aumentar la dificultad de recuperar las células para aplicaciones posteriores.

Tomado y modificado de Centeno, 2018.

Modelos organoides en 3D

Uno de los subtipos de cultivo en 3D son los denominados *organoides* (técnica sin andamios); estos permiten reflejar la funcionalidad, la arquitectura y las características geométricas de los órganos y tejidos *in vivo*; sin embargo, cuentan con limitaciones, como la ineficiente reproducibilidad, un alto costo, y la difícil manipulación y configuración.

Los organoides son estructuras conformadas por múltiples tipos de células autoorganizadas, y demuestran ser un modelo superior a las configuraciones de cultivo 2D (tabla 6). Por lo general, los organoides se basan en técnicas sin andamios; pero se pueden combinar con el uso de matrices (andamios), con el fin de proporcionar estructuras y señales fisicoquímicas para la correcta organización del tejido u órgano. La matriz más utilizada es el Matrigel®, aunque se ha reportado la efectividad de los métodos esferoides (sin andamios) que son alternativos y simplificados.

Dentro de las limitaciones de los modelos organoides se encuentran los problemas de reproducibilidad, debido a que no existe un adecuado control sobre las células, que se autoorganizan autónomamente; por tanto, es imposible garantizar replicaciones exactas de organoides de las mismas dimensiones (tamaño y forma), composición celular, características fenotípicas y moleculares. Esto representa un impedimento para ensayos clínicos y farmacéuticos, al no poseer un verdadero control de seguridad y calidad terapéutica. En la actualidad, se está buscando la estandarización de los organoides; sin embargo, la reproducibilidad ha sido una característica difícil de lograr.

De igual manera, la vascularización constituye una meta difícil de alcanzar; implica generar una extensa red vascular que se compone de capas robustas de células musculares lisas endoteliales y vasculares que muestran fenotipos funcionales, como la permeabilidad del endotelio o la contracción. La vascularización permite el suministro homogéneo de nutrientes a todas las células que componen el organoide, lo que facilita la investigación de fármacos y el análisis de toxicidad. En cuanto a trasplantes, un organoide vascularizado podría ser injertado en pacientes, ya que podría integrarse con la red vascular del paciente. Sin embargo, hasta el momento solo se han obtenido modelos vascularizados en 3D como los modelos de cáncer para estudiar la angiogénesis y tejidos adiposos para mejorar el desarrollo de tejidos blandos aplicables a medicina regenerativa.

A pesar de que los organoides han permitido el modelado de enfermedades y la recreación de interacciones celulares complejas dentro de un microambiente esférico, aún es un desafío imitar los procesos dinámicos de perfusión e inflamación sanguínea *in vivo*, donde

se involucran una multitud de tipos de células (células endoteliales, monocitos, macrófagos, leucocitos) en procesos de adhesión celular (células endoteliales-leucocitos), extravasación de leucocitos, trans migración y diferenciación celular (de monocitos a macrófagos).

El tejido sanguíneo representaría un componente fundamental, ya que alberga las células inmunes que interactúan a través de la quimioatracción y con las paredes de los vasos sanguíneos (por medio de las moléculas de adhesión presentadas por las células endoteliales). Por consiguiente, es importante reconocer que para imitar procesos dinámicos de perfusión e inflamación sanguínea se debe establecer inicialmente la vascularización. Hoy en día, no se han logrado desarrollar con éxito los denominados “cultivos en balsa”, que consisten en una estructura 3D multicapa soportada por matrices de colágeno y expuesta a una interfaz de cultivo aire-líquido, con el fin de imitar la piel real; sin embargo, no se logró establecer perfusión sanguínea al no producirse hiperpermeabilidad de los vasos ni la vasodilatación usual al inicio de una inflamación aguda.

En un futuro, lograr un modelo organoide que pueda incorporar de manera satisfactoria la vascularización y los procesos de inflamación se constituirá en una herramienta valiosa para el estudio de enfermedades vasculares ateroscleróticas, enfermedades inflamatorias de la piel, nefritis intersticial e, incluso, enfermedad inflamatoria intestinal.

Modelos de ratones humanizados

Los modelos murinos han permitido el modelado de enfermedades. Los de uso más común son los ratones inmunodeficientes (como el ratón desnudo y el ratón con inmunodeficiencia combinada grave), que debido a su inmunodeficiencia no presentan reacción al ser trasplantados con células extrañas, lo que les facilita ser receptores de células o tejidos humanos.

Por otro lado, se encuentran los ratones humanizados, a los cuales se les retira el sistema inmunológico innato para remplazarlo con células inmunológicas humanas por medio del trasplante de CMH. Los modelos murinos humanizados permiten el modelamiento de enfermedades, ya que facilitan la búsqueda de blancos terapéuticos al mostrar un entorno *in vivo* y una fisiología similar a la humana, debido a la

presencia de un sistema inmune completo y de circulación sanguínea, lo cual es imposible de recrear en modelos 2D. Sin embargo, los modelos de ratón para estudiar enfermedades humanas han sido cuestionados, debido a que se han reportado diferencias fundamentales entre el sistema inmunológico de los roedores y el de los humanos. Además, como los organoides en 3D aún deben enfrentar varios desafíos, es necesario validar su uso empleando un modelo de ratón humanizado.

Tabla 6. Comparación entre sistemas de modelos 2D y modelos organoides 3D

Consideraciones técnicas y experimentales	Modelo 2D	Modelo 3D de organoides
Costo	Bajo	Moderado a alto
Facilidad de configuración	Fácil a moderada complejidad	Alta complejidad
Tiempo requerido	Bajo	Moderado a alto
Interacciones célula-MEC	Ambiente artificial	Imita el entorno natural
Reproducibilidad	Alto	Bajo
Vascularización	No	Moderadamente posible
Perfusión sanguínea	No	Moderadamente posible
Inflamación	Las técnicas de cocultivo permiten una forma simple de modelar la inflamación	Más tecnologías mejoradas permiten modelar la complejidad de la inflamación

Tomada y modificada de Ho, 2018.

Los cultivos 3D recrean con mayor similitud el microambiente de una CM *in vivo*. Para ello, es importante diseñar una adecuada MEC (hidrogel, alginato, ácido hialurónico, células alimentadoras) y evitar la formación de agregados, mediante el empleo de microportadores. Estos deben ser seleccionados según el tipo de CM, características (tamaño, morfología, eficiencia clonal) y requerimientos (expansión, diferenciación, recolección de células). Existen microportadores biodegradables, los cuales facilitan la separación célula-perla.

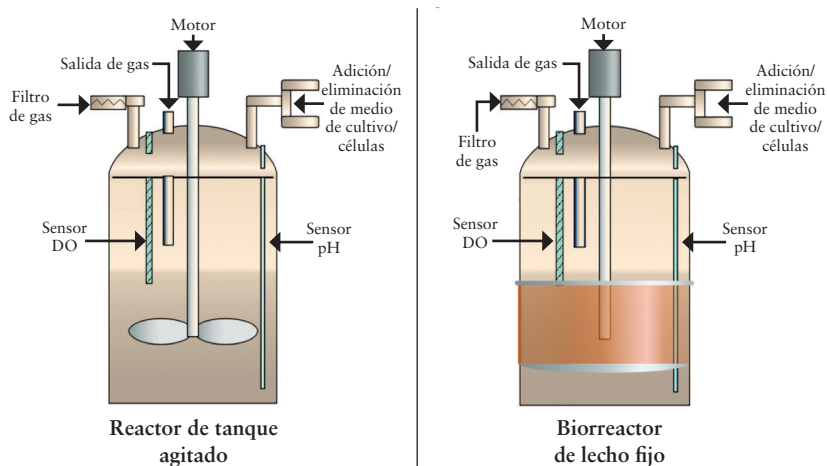
Biorreactores para expansión de células madre

El uso de biorreactores representa una alternativa viable a los sistemas de cultivo planar en expansiones de CM. El biorreactor se define como un sistema de cultivo en el que hay un adecuado monitoreo y control de variables (como el pH, la temperatura, el O_2 y la concentración de CO_2) para el mantenimiento de un entorno fisicoquímico homogéneo para las células, así como para el soporte de la adhesión celular (células adherentes) cuando sea necesario.

El biorreactor usado para expansión de CM debe ser fácil de operar; debe permitir la supervisión y el control en línea de los parámetros de cultivo y alcanzar altas densidades celulares. También debe facilitar la recolección de células viables y ser eficaz en términos de costo y tiempo. Hay disponibles configuraciones desechables de hasta 2000 litros, y son preferidas debido a la eliminación de los pasos de limpieza y esterilización (figura 9).

El uso de microportadores —que suelen tener forma esférica (perlas o esferas microscópicas)— proporciona una alta relación de área-superficie a volumen en condiciones de proceso controladas por

Figura 9. Biorreactores para expansión de CM



Tomada y modificada de Mizukami, 2018.

completo en expansiones de CM realizadas en biorreactores instrumentados. Además, la superficie de crecimiento se puede aumentar dentro del sistema de biorreactores hasta cierto punto, lo que mejora la consistencia del producto y disminuye los costos. El uso de microportadores aumenta el área superficial en un cultivo de tejido para la adhesión y recuperación de células dependientes de anclaje; además, muchas veces se comercializan esterilizados previamente para facilitar la producción celular y garantizar mayor seguridad.

El tipo de microportador desempeña un papel clave en el proceso de expansión celular, donde es importante que los atributos de calidad crítica no cambien. Numerosos tipos de microportadores disponibles en el comercio se han probado en combinación con CM y biorreactores. Los tipos de microportadores difieren enormemente en tamaño (90-380 μm), en material del núcleo (poliestireno modificado, celulosa, dextrano, gelatina), así como en el revestimiento de la superficie (colágeno, fibronectina, dietilaminoetilo, trietilamonio). El material del núcleo y el revestimiento de la superficie no solo afectan el asentamiento del microportador y el crecimiento celular, sino también la velocidad del impulsor requerida para mantener los microportadores en suspensión y garantizar una transferencia de masa suficiente.

En 2016, Florian Petry y colaboradores examinaron diferentes tipos de microportadores en biorreactores a pequeña escala para CMM con velocidades de impulsor predefinidas para mantener los microportadores en suspensión. Hallaron diferencias en la unión celular, el crecimiento celular, el consumo de glucosa y en la producción de metabolitos (por ejemplo, lactato y amoníaco) según el tipo de microportador. Encontraron que las CMM tienen el mejor rendimiento de crecimiento en microportadores de colágeno, Synthemax® II y ProNectin® F, ya que estos microportadores están recubiertos con colágeno y fibronectina, respectivamente. Ambos recubrimientos son componentes de la MEC, incluida la secuencia de ácido arginil-glicil-aspartico.

Se ha demostrado que diferentes sustratos de la superficie de los microportadores pueden causar un cambio en el fenotipo, el cual es notorio por una reducción en el nivel de expresión de diferentes marcadores de superficie (por ejemplo, CD90, CD105, CD166). Además, se ha comprobado que la estructura planar —incluidas la rigidez del

material, la nanotopografía y la curvatura local— puede afectar la proliferación de CM, el mantenimiento del fenotipo y la diferenciación. Por lo tanto, se siguen realizando esfuerzos para desarrollar nuevos microportadores biodegradables. Hasta ahora, la eficiencia del asentamiento de microportadores que cubre la unión y la propagación de las células y el crecimiento de CM también depende del proceso de siembra de células.

Por lo tanto, es importante inocular con una alta proporción de células a perlas para lograr una distribución de células homogénea, en la que cada microportador esté ocupado por al menos una célula viable. Normalmente, se utiliza una concentración celular teórica de tres a cinco células por microportador. Después de la fase de unión —que suele tomar entre 4 y 20 horas en condiciones de agitación estática o intermitente—, cada microportador debe tener el mismo número de células adheridas a su superficie. Sin embargo, en la práctica no es este el caso. Se ha demostrado que una siembra de células subóptima da como resultado la formación temprana de grandes agregados de microportadores de CM (hasta 4-5 mm) que perjudican el crecimiento celular y las características de las CM.

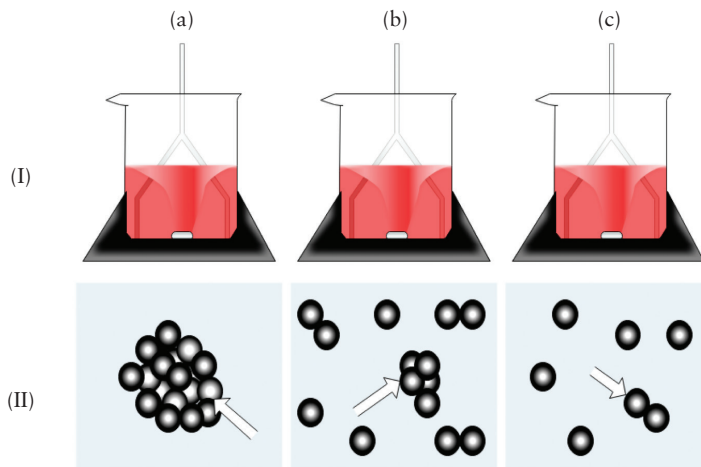
El tamaño de los agregados también influye en el cultivo en biorreactores y puede ser controlado por la velocidad del impulsor y las fuerzas hidrodinámicas resultantes. Este hallazgo podría explicarse por la mayor frecuencia de interacciones partícula-partícula que facilitan una agregación, siempre que las fuerzas hidrodinámicas que pueden causar un desprendimiento de células no sean demasiado altas. Los agregados grandes pueden ir acompañados de una disminución en el número de células, lo que se explica por la viabilidad reducida en los núcleos de los agregados (figura 10). Sin embargo, aún no se comprende por completo en qué medida la formación de agregados de microportadores de CM tiene una influencia en la calidad de la célula y qué influencia tiene la composición del medio en las características de las CM.

El procedimiento de recolección en un cultivo basado en microportadores es un paso esencial, ya que las células serán el producto final. Típicamente, los microportadores colonizados con células se tratan con enzimas proteolíticas, y las células desprendidas se separan de los

microportadores mediante filtración. Las enzimas proteolíticas dividen los enlaces covalentes que se formaron entre la capa superficial del andamio y las integrinas en la superficie celular.

Figura 10. Efecto de la velocidad del impulsor en la formación de aglomerados.

(I) Imágenes macroscópicas y (II) imágenes microscópicas de aglomerados de microportadores de CM: a. 25 rpm, b. 49 rpm y c. 120 rpm, en matraces giratorios de un solo uso. Las flechas blancas indican los aglomerados de microportadores de CM.



Tomada y modificada de Jossen, 2018.

Biorreactores de un solo uso para cultivo de células madre

Los biorreactores de un solo uso tienen un recipiente de cultivo rígido cilíndrico (hecho de poliestireno o policarbonato) o una bolsa flexible (con una capa de contacto de polietileno o etileno acetato de vinilo). La bolsa está fijada y formada por un contenedor de soporte hecho de acero inoxidable y es similar a una almohada en forma de cubo o cilíndrica. Debido a que el fabricante proporciona preesterilizadas las cámaras de cultivo, los procedimientos de esterilización y de limpieza se vuelven obsoletos. Además, se reduce el riesgo de contaminación cruzada, lo que hace que el proceso de expansión de CM sea más seguro.

Respecto a los biorreactores de un solo uso, se ha demostrado que ofrecen más beneficios, pues la unidad de cultivo solo se usa una vez y se desecha después. Para los sistemas de cultivo estáticos de un solo uso (matraces de múltiples capas planares), las desventajas están bien descritas. Por tanto, su uso está asociado con una transferencia de masa ineficiente, la presencia de gradientes de nutrientes, y un monitoreo y control de procesos inadecuados. En cualquier caso, los matraces planos multicapa se usan con mayor frecuencia en la fabricación comercial de CM (tabla 7).

Biorreactor de tanque agitado

La expansión de CMM en biorreactores de tanque agitado —debido a su naturaleza dependiente del anclaje— requiere el uso de microportadores, pequeñas perlas (100-300 μm de diámetro) que se mantienen en suspensión fácilmente, lo que proporciona la superficie para que las células se adhieran y crezcan. En este biorreactor, los impulsores se utilizan para promover la mezcla, dando como resultado un sistema de cultivo homogéneo, que permite monitorear y controlar los parámetros de cultivo, y la eliminación constante de muestras. Entre las principales ventajas se encuentran: la homogeneidad del sistema, la operación amigable y el escalado, y la versatilidad de la operación (lote, alimentación discontinua y perfusión). Se puede producir una gran cantidad de células en un solo recipiente, lo que evita la variabilidad entre lotes y minimiza los costos relacionados con la mano de obra y los consumibles.

La selección de un microportador apropiado es una variable crítica de un bioprocesamiento de expansión y debe basarse en una metodología sistemática. El microportador ideal no solo debe ser capaz de soportar un acoplamiento y crecimiento de células eficientes, sino que también debe permitir una fácil recolección de células sin perder las propiedades de las CM. Una de las principales desventajas de expandir las células en microportadores —en biorreactores de tanque agitado— es la formación de aglomerados de microportadores celulares que impiden la transferencia de nutrientes a las células dentro del aglomerado y también perjudica la recolección de células. Se prefiere un microportador con carga neutra (un microportador con carga

positiva que atrae las células por fuerzas electrostáticas) y biodegradable (degradable con digestión enzimática) para evitar un alto nivel de aglomeración.

Biorreactor oscilante de onda

Este biorreactor consiste en una bolsa de plástico desechable colocada en una plataforma, cuyo movimiento fluido agitado induce la formación de ondas que, a su vez, proporcionan una buena distribución de nutrientes y una excelente transferencia de oxígeno; esto resulta en un entorno de cultivo óptimo para el crecimiento celular. También presenta un riesgo mínimo de contaminación (sistema cerrado), escalabilidad y flexibilidad. Este sistema de cultivo también requiere microportadores para la expansión de las CM.

Biorreactor de fibra hueca

Se consideran una buena opción para la expansión de CM debido a su entorno relativamente homogéneo, bajo esfuerzo de corte y fibras para la adhesión celular. Los biorreactores de fibra hueca consisten en capilares porosos (fibras huecas) contenidos en un cilindro externo paralelo. Por lo general, las células se inoculan dentro de la fibra o espacio intracapilar (EIC). El espacio extracapilar (EEC) entre el cilindro y las fibras es donde fluye el medio de cultivo y los nutrientes se difunden a través de los poros de las fibras hasta el EIC, lo que permite la nutrición de las células retenidas en él. Además, los desechos metabólicos producidos por las células pueden penetrar a través de la fibra y pueden ser transportados por el flujo.

Biorreactor de cama fija

Consiste en una columna (cama) que contiene o sostiene un andamio inmovilizado en donde se inoculan las células. El andamio debe tener una área de superficie grande para el crecimiento celular y la estabilidad química. Una vez que las células permanecen inmovilizadas en la superficie del andamio, este sistema tiene la ventaja de presentar un ambiente de bajo esfuerzo cortante. Aunque este biorreactor permite un crecimiento celular tridimensional y una mejor imitación de las condiciones *in vivo*, pueden producirse gradientes de concentración espacial.

Tabla 7. Principales características de los sistemas de cultivo y biorreactores empleados para la fabricación de CM

Características	Matraces multicapa	Biorreactor de tanque agitado	Biorreactor oscilante	Biorreactor de cama fija	Biorreactor de fibra hueca
Homogeneidad	No	Sí	Sí	No	Moderado (gradientes de concentración espacial)
Control de parámetros de cultivo y seguimiento	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Aumentar proporcionalmente	Limitado	Moderado	Moderado (hasta 500 L)	Moderado	Moderado
Riesgo de contaminación	Alta (sistema abierto)	Bajo (sistema cerrado)	Bajo (sistema cerrado)	Bajo (sistema cerrado)	Bajo (sistema cerrado)
Esfuerzo cortante	No	Alto	Moderado	Bajo	Bajo
Transferencia de oxígeno	Bajo	Alto	Alto	Moderado	Alto
Modo de operación del cultivo	Lote	Lote, lote alimentado, perfusión	Lote, lote alimentado, perfusión	Lote, lote alimentado, perfusión	Perfusión
Cosecha de células	Fácil	Difícil	Difícil	Difícil	Fácil

Tomada y modificada de Mizukami, 2018.

Procesamiento posterior de células madre después de obtener un biorreactor

El procesamiento posterior de células madre (PPC) implica varios pasos complejos; entre ellos están: la recolección de células, el desprendimiento de células del andamio, la eliminación (clarificación) de microportadores (andamiaje), la reducción de volumen, el lavado de células seguido de la formulación y la crioconservación. El PPC de la fabricación de CM tiene una alta proporción de cuellos de botella debido al poco tiempo disponible para transferir CM del medio de cultivo al estado crioconservado. Esta es la razón por la cual la capacidad de producción está limitada a 150-200 L por lote en las producciones alogénicas de CM en la actualidad.

Para obtener un producto celular altamente puro, con una viabilidad y funcionalidad adecuadas, todo el proceso de PPC debe cumplir con los requisitos específicos, que incluyen el tiempo de procesamiento reducido, la reducción de gran volumen, el lavado eficiente (para disminuir los niveles de impureza a <1 ppm) y un bajo esfuerzo de corte. Además, el sistema debe ser cerrado, automatizado y escalable.

Después de las etapas de concentración y lavado, las células se formulan utilizando un tampón de crioconservación específico. Dado que la terapia basada en CM está diseñada para uso alogénico, es necesario tener un gran inventario disponible. Luego, el llenado de viales a gran escala debe realizarse utilizando sistemas automatizados y también se requerirá que los congeladores de velocidad controlada procesen miles de viales por lote. La combinación de todos estos sistemas automatizados y cerrados permitirá el mantenimiento de la calidad del producto celular.

El primer paso después de que se haya completado el cultivo del biorreactor es el desprendimiento de las células de los microportadores, que se realiza más que todo con enzimas proteolíticas (por ejemplo, la tripsina). Aquí, los objetivos de la enzima proteolítica son las proteínas de adhesión en la superficie celular. Sin embargo, si se utilizan microportadores biodegradables, se aplica una mezcla de dos enzimas, donde la segunda enzima (por ejemplo, la colagenasa) se dirige a la estructura del microportador. El desarrollo de microportadores biodegradables es el foco de los últimos desarrollos, ya que reducen

de modo significativo la complejidad de la etapa de separación posterior. Sin embargo, en ambos casos, el desprendimiento de las CM de la superficie del microportador se ve afectado por el recubrimiento de la superficie (por ejemplo, componentes como el colágeno o la fibronectina). En este caso, es decisivo optimizar el procedimiento de desprendimiento de células con respecto al tiempo máximo en que las células pueden estar expuestas a la enzima, así como al pH y la temperatura para una actividad enzimática óptima.

Además de estos aspectos, también es importante considerar la inhibición de la enzima o los inhibidores proteolíticos después del desprendimiento de células para detener la reacción enzimática. En general, el desprendimiento de células se realiza principal y directamente en el sistema de biorreactor, porque el sistema proporciona un control ambiental preciso. Al final del cultivo, el impulsor se detiene y los microportadores se dejan reposar en el fondo del reactor antes de que el medio gastado se retire a través de un tubo de inmersión. En ese punto, la velocidad de sedimentación de los microportadores o agregados de microportadores celulares es importante. Los microportadores con una densidad cercana a la densidad media son beneficiosos para mantenerlos en suspensión, pero no para la recolección. En el último caso, la tecnología de filtración tangencial alternativa (FTA) se puede usar antes del desprendimiento de células para concentrar y lavar la suspensión de microportadores de CM.

Los módulos de FTA son dispositivos efectivos para filtrar grandes volúmenes de cultivo, mientras que se minimiza el ensuciamiento de la membrana de filtración por los microportadores. Sin embargo, es importante definir los tiempos del ciclo y las condiciones óptimas del ciclo para garantizar una alta recuperación de las células. Durante el proceso de desprendimiento de células, normalmente se aplican cargas mecánicas específicas para facilitar el desprendimiento de células. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la potencia de entrada máxima y la duración del tratamiento enzimático resultante están influenciadas por el tipo de biorreactor y sus impulsores.

Después del desprendimiento celular, las células deben separarse de las perlas de microportadores, un proceso que se suele realizar mediante filtración por exclusión de tamaño basada en las diferencias

de tamaño entre CM desprendidas (15-20 μm) y microportadores (>90 μm). A pequeña escala, la separación de perlas con frecuencia se realiza utilizando pequeños tamices estériles, como filtros de células de la casa comercial Corning o filtros de sangre de la empresa Baxter Healthcare. Independientemente del dispositivo y de la escala utilizados, lo relevante son las recuperaciones celulares y las viabilidades que superan el 90 %. Se debe hacer especial énfasis en las partículas; esto es cierto en especial cuando se pueden generar residuos de microportadores bombeando la suspensión. Si los residuos de microportadores resultantes son más pequeños que el tamaño del poro del filtro, pueden contaminar el producto terapéutico final.

Por último, se requiere lavado de células después del desprendimiento de células para eliminar cualquier componente no deseado, como residuos de sFB, enzimas o residuos de microportadores de la suspensión celular. El lavado se acostumbra hacerlo junto con la etapa de concentración celular, debido a los altos números de células requeridos en la formulación final (entre 10^6 - 10^7 células/mL). El lavado y la concentración de células se realizan mediante la técnica de filtración de flujo tangencial (FFT) o mediante centrifugación.

La tecnología de FFT está bien establecida en la purificación de proteínas terapéuticas basadas en células de mamíferos. Aquí, las proteínas en el lado del filtrado son el producto deseado. Además, la tecnología FFT se puede adaptar para la fabricación de CM manteniendo suficientemente bajas la velocidad de corte y la presión; esto significa que no se permite que la viabilidad celular y el fenotipo celular se vean afectados durante la concentración y el lavado. El flujo y la presión óptimos se deben analizar al inicio del proceso para maximizar la recuperación celular.

La tecnología de centrifugación clásica es subóptima para el procesamiento de las CM, ya que las fuerzas centrífugas compactan las células entre sí y contra una superficie sólida; luego las células deben ser segregadas de forma mecánica y esto puede resultar perjudicial para las células, y reducir la recuperación celular y la eficacia del lavado. En la tecnología FFT, las CM se concentran en un lecho fluidizado bajo un flujo continuo, mientras que el sobrenadante transparente se elimina en forma continua.

Independiente de la tecnología y de los dispositivos utilizados para el lavado y la concentración de células durante la fabricación de CM, se debe demostrar que el medio de cultivo de CM concentrado no contiene impurezas. Esto también se aplica al intercambio de medio posterior, que es ejecutado con dispositivos de diafiltración y que representa el último paso del PPC en la fabricación de CM.

Bibliografía consultada

- Arbósa, A., Nicolau, F., Quetglas, M., Ramis, J. M., Monjo, M., Muncunill, J., Calvo, J. y Gayà, A. (2013). Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunología*, 32(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2012.11.002>
- Bao, M., Xie, J. y Huck, W. T. S. (2018). Recent advances in engineering the stem cell microniche in 3D. *Advanced Science*, 5(8), 1800448. <https://doi.org/10.1002/advs.201800448>
- Bartfeld, S. y Clevers, H. (2017). Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *Journal of Molecular Medicine*, 95(7), 729-738. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1531-7>
- Brizuela, C., Galleguillos, S., Carrión, F., Cabrera, C., Luz, P. e Inostroza, C. (2013). Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de pulpa y folículo dental humano. *Int. J. Morphol.*, 31(2), 739-746. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022013000200063>
- Centeno, E. G. Z., Cimarosti, H. y Bithell, A. (2018). 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0258-4>
- Donnelly, H., Salmeron-Sanchez, M. y Dalby, M. J. (2018). Designing stem cell niches for differentiation and self-renewal. *Journal of the Royal Society Interface*, 15(145). <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0388>
- Eto, S., Goto, M., Soga, M., Kaneko, Y., Uehara, Y., Mizuta, H. y Era, T. (2018). Mesenchymal stem cells derived from human iPS cells via mesoderm and neuroepithelium have different features and therapeutic potentials. *Plos One*, 13(7), e0200790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200790>
- Ho, B. X., Pek, N. M. Q. y Soh, B. S. (2018). Disease modeling using 3D organoids derived from human induced pluripotent stem cells. *International*

- Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 936. <https://doi.org/10.3390/ijms19040936>
- Jun, D. Y., Kim, S. Y., Na, J. C., Lee, H. H., Kim, J., Yoon, Y. E., Hong, S. J. y Han, W. K. (2018). Tubular organotypic culture model of human kidney. *Plos One*, 13(10), e0206447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206447>
- Liu, Z., Tang, M., Zhao, J., Chai, R. y Kang, J. (2018). Looking into the Future: Toward Advanced 3D Biomaterials for Stem-Cell-Based Regenerative Medicine. *Advanced Materials*, 30(17), e1705388. <https://doi.org/10.1002/adma.201705388>
- Mizukami, A. y Swiech, K. (2018). Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2018/4083921>
- Osiecki, M. J., Michl, T. D., Kul Babur, B., Kabiri, M., Atkinson, K., Lott, W. B., Griesser H, J. y Doran, M. R. (2015). Packed bed bioreactor for the isolation and expansion of placental-derived mesenchymal stromal cells. *Plos One*, 10(12), e0144941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144941>
- Paim, A., Tessaro, I. C., Cardozo, N. S. M. y Pranke, P. (2018). Mesenchymal stem cell cultivation in electrospun scaffolds: mechanistic modeling for tissue engineering. *Journal of Biological Physics*, 44(3), 245-271. <https://doi.org/10.1007/s10867-018-9482-y>
- Perez-Estenaga, I., Prosper, F. y Pelacho, B. (2018). Allogeneic mesenchymal stem cells and biomaterials: the perfect match for cardiac repair? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103236>
- Petry, F., Smith, J. R., Leber, J., Salzig, D., Czermak, P. y Weiss, M. L. (2016). Manufacturing of human umbilical cord mesenchymal stromal cells on microcarriers in a dynamic system for clinical use. *Stem Cells Int*. <https://doi.org/10.1155/2016/4834616>
- Petry, F., Weidner, T., Czermak, P. y Salzig, D. (2018). Three-dimensional bioreactor technologies for the cocultivation of human mesenchymal stem/ stromal cells and beta cells. *Stem Cells Int*. <https://doi.org/10.1155/2018/2547098>
- Sane, M. S., Misra, N., Mousa, O. M., Czop, S., Tang, H., Khoo, L. T., Jones, C. D. y Mustafi, S. B. (2018). Cytokines in umbilical cord blood-derived cellular product: a mechanistic insight into bone repair. *Regenerative Medicine*, 13(8), 881-898. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0102>

Sart, S. y Agathos, S. N. (2018). Towards three-dimensional dynamic regulation and in situ characterization of single stem cell phenotype using microfluidics. *Molecular Biotechnology*, 60(11), 843-861. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0113-4>

Aplicaciones de las células madre

OLGA LUCÍA OSTOS ORTIZ
RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA

Las CM constituyen una promesa para muchos campos de investigación básica, aplicada, preclínica y clínica. Su papel en investigación ha sido demostrado gracias a su potencial de diferenciación, multilinaje, secreción de moléculas antiinflamatorias y los efectos inmunorreguladores. Las CM se consideran una fuente celular prometedora para el tratamiento de enfermedades crónicas, autoinmunes, inflamatorias, degenerativas y, en la actualidad, también se han explorado en diferentes fármacos como potenciales terapéuticos. Han sido estudiadas las CME, las CMPi y las CMA, entre las que se encuentran las CMM. Es importante resaltar que una de las aplicaciones de las CM en el ámbito clínico es la medicina regenerativa, que constituye el área de mayor acción, entre muchas otras.

Aplicaciones de las células madre en medicina regenerativa

Las CM son ideales en la medicina regenerativa porque pueden someterse a autorrenovación indefinida conservando la pluripotencia, lo que les permite diferenciarse en cada tipo de célula del cuerpo. Un factor importante para el desarrollo y la homeostasis del tejido es el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación de las CM.

El eje principal de la medicina regenerativa es el remplazo celular y regeneración de tejidos alterados en enfermedades crónicas como

diabetes mellitus, enfermedad de Parkinson y algunas enfermedades cardiovasculares; en estos casos se remplazan células dañadas por células funcionales, que son capaces de restaurar la normalidad de tejidos u órganos en cuanto a su estructura y funcionalidad. Todo esto lo hacen por medio de la reparación de vías biológicas de señalización disfuncionales o de modulación de la respuesta inmune local o sistémica.

Se ha visto que, gracias a su potencial migratorio, las CM y las CMM se alojan en un principio en la zona dañada del tejido u órgano (*homing*), lo que facilita la reparación después de procesos traumáticos, degenerativos, isquémicos o inflamatorios. Hoy se afirma que las CM poseen una modalidad de comunicación por medio de microvesículas que contienen ácido ribonucleico mensajero (ARNm), micro-ARN y proteínas, que se liberan como exosomas en el medio intercelular; esto contribuye a restringir la lesión tisular y a inducir el reingreso, probado para diferentes aplicaciones en reparación cardíaca, neuronal o musculoesquelética.

El *homing* es la capacidad de retorno de las CM al sitio de lesión, donde las células interactúan con los tejidos del huésped y secretan factores tróficos. Se ha demostrado que las metaloproteasas de matriz (MPM) reguladas por citocinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α y TGF- β 1) son importantes en la migración de las CM. El *homing* se encuentra determinado por la edad (CM recién aisladas muestran mayor eficiencia de *homing*), condiciones de cultivo, el número de pases celulares y el método de administración. Respecto a la forma de administración, la endovenosa e intraarterial no son tan efectivas, debido a que las CM quedan atrapadas en los capilares de los diversos tejidos, en especial, de los pulmones; por consiguiente, lo más recomendable es la inyección de las células en la zona de la lesión o en su alrededor.

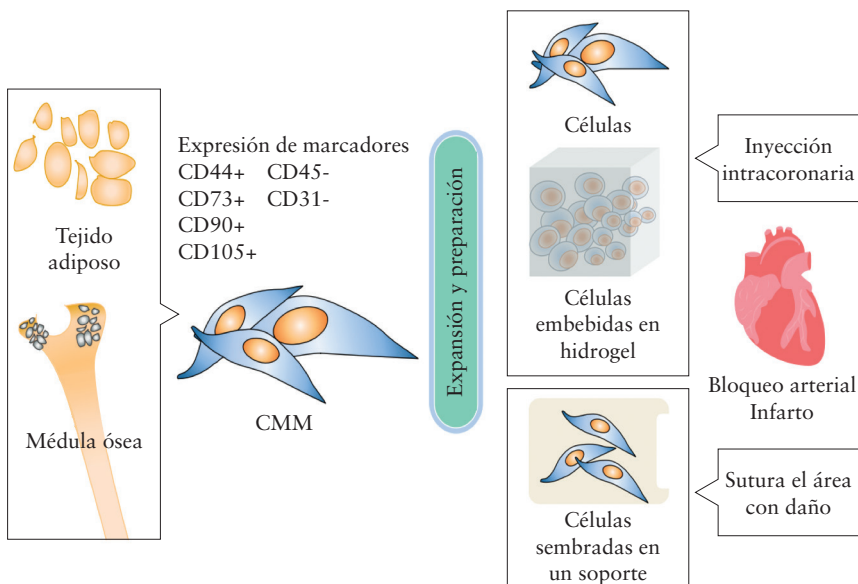
Con el fin de apoyar el uso de las CM en medicina regenerativa o terapia celular, en la actualidad se incentiva la creación de bancos de CM para uso terapéutico teniendo en cuenta el origen de la CM. Por ejemplo, células autólogas, células derivadas de MO, cordón umbilical y tejido adiposo; y células derivadas de animales genéticamente modificados. El ejemplo más representativo es la terapia celular con CM obtenidas de MO, que ha sido útil en tratamientos de tipo alogénico y autólogo con el fin de restaurar células hematopoyéticas; su único

inconveniente ha sido la cantidad de CM que pueden aislarse de la MO. Por otro lado, se han realizado estudios en enfermedades cardíacas, ortopédicas y en ingeniería de tejidos.

Medicina regenerativa en enfermedades cardíacas

En las últimas dos décadas, la terapia celular se ha convertido en una nueva alternativa para el tratamiento de cardiopatías. Diferentes tipos de CM —como las derivadas de MO, corazón, mioblastos esqueléticos, células progenitoras endoteliales y CMM— se han probado tanto a nivel experimental como clínico. Las CMM se consideran como una opción para la terapia celular regenerativa en enfermedades coronarias debido a sus propiedades tróficas, paracrinas e inmunomoduladoras, además de ser inmunoprivilegiadas (no expresan CMH-II y niveles bajos de CMH-I; tampoco expresan moléculas coestimuladoras, como CD40, CD80 o CD86); y permiten su utilización como aloinjerto (figura 11).

Figura 11. Beneficio terapéutico de las CMM derivadas de la médula ósea y del tejido adiposo para la terapia cardíaca

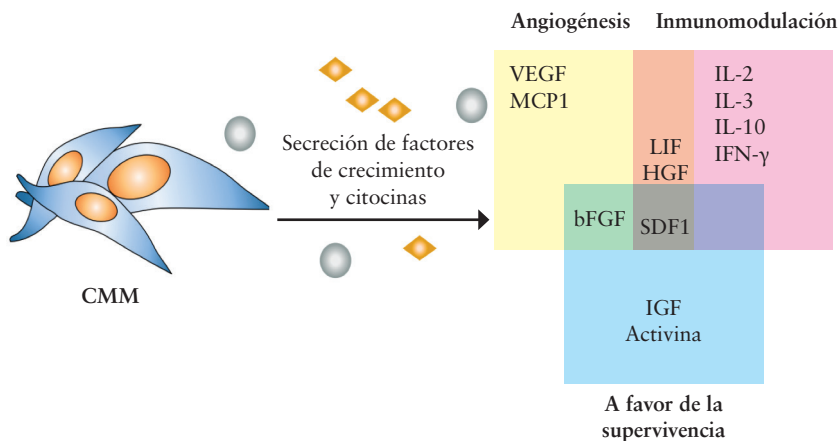


Tomada y modificada de Perez-Estenaga, 2018.

Los estudios han demostrado que las CMM ejercen efectos beneficiosos sobre la isquemia del tejido cardíaco generando vasculogénesis, angiogénesis y regulación de componentes de la MEC, lo que conlleva la supervivencia celular. Dichos efectos se deben, en primer lugar, a acciones paracrinas, como la secreción de citocinas y factores de crecimiento; y a acciones inmunomoduladoras, como la inhibición de la activación y proliferación de los linfocitos T y B; el bloqueo de la diferenciación de monocitos a células dendríticas; la disminución de la regulación de moléculas de células presentadoras de antígeno; la reducción de la actividad citotóxica de las *natural killer* y la ayuda a la maduración de los monocitos en macrófagos antiinflamatorios (figura 12).

En la realización de estudios preclínicos, la terapia con CMM se ha experimentado en ratones, cerdos y perros, en los cuales no se han evidenciado efectos adversos ni problemas de seguridad. Por el contrario, se han observado efectos positivos, como recuperación de la función cardíaca, remodelación del miocardio, formación reducida de cicatrices, aumento de la vascularización, mejora de parámetros hemodinámicos, aumento del grosor de la pared y de las dimensiones diastólicas finales del ventrículo izquierdo, lo que ha conducido a efectuar estudios clínicos en pacientes. En la actualidad existen dos ensayos representativos que son: el Apollo y el Prometheus. En el estudio Apollo se

Figura 12. Beneficio terapéutico de las CMM en la terapia cardíaca



Tomada y modificada de Perez-Estenaga, 2018.

experimentó con CMM derivadas de tejido adiposo autólogo (CMMTA) por medio de administración intracoronaria en pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM); no se presentaron efectos adversos graves y se evidenció una reducción del área infartada y una mejora significativa en la perfusión. En el ensayo Prometheus, se administraron CMM autólogas en pacientes con cardiomiopatía coronaria crónica; no se evidenciaron eventos adversos, y se observó mejora en la función cardíaca, reducción de la masa de tejido cicatricial y aumento de tejido viable.

Aunque se han demostrado los beneficios del trasplante autólogo de CMM en humanos, este presenta ciertas limitaciones, como el tiempo usado en el aislamiento, expansión y validación *in vitro* de las células, además de la variabilidad interindividual. Por estas razones, se diseñaron dos ensayos clínicos (Prochymal y Poseidon) en pacientes que fueron trasplantados con CMM alogénicas; en ellos se evidenció funcionalidad. En ambos ensayos, las CMM derivadas de MO se administraron por vía endovenosa a pacientes con IAM que mostraron mejoría en la funcionalidad cardíaca, con un aumento de los volúmenes sistólicos y una reducción del tamaño del infarto; además, se presentó una baja incidencia de reacciones adversas, que se correlacionó con la baja alorreactividad entre donante-receptor.

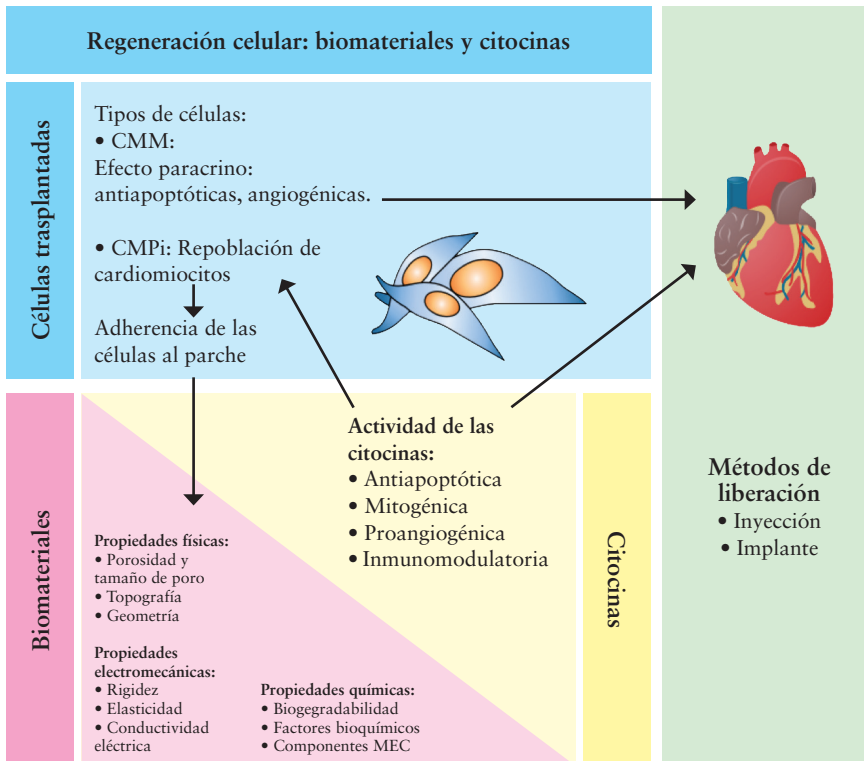
Cabe destacar que se deben establecer más ensayos de seguridad en el trasplante alogénico de CMM antes de incluirlos como rutina clínica, debido a que se han presentado casos de alorreconocimiento de CMM por parte de las células inmunes del receptor, lo que influye en la supervivencia de las CMM en la zona de implantación. Se han detectado aloanticuerpos contra CMM alogénicos diferenciados en la sangre de los receptores y se ha evidenciado secreción de interleucina 6 (IL-6), considerada una citocina inflamatoria que desempeña un papel en el rechazo de aloinjerto. Sin embargo, a pesar de que parece existir una respuesta inmune leve, se sugiere que esto no restringiría el efecto terapéutico ejercido por las CMM trasplantadas.

Hoy en día se están diseñando estrategias para mejorar la efectividad y robustez del trasplante de CMM —como el uso de biomateriales, hidrogeles y andamios celularizados— debido a que se han presentado casos donde se evidencia baja tasa de injerto y deficiente supervivencia después de la administración en el corazón, lo que ha

impedido su uso clínico a gran escala. Las características del biomaterial, tales como composición, elasticidad, porosidad, viscosidad, micro y nanoestructura, influyen en gran medida en la biocompatibilidad con el organismo huésped; además, da soporte mecánico para al corazón infartado y brinda la posibilidad de transportar células al miocardio dañado.

En suma, las CMM se han integrado a matrices de colágeno para formar un parche cardíaco que luego se sutura al corazón infartado (figura 13), mostrando una mejora funcional significativa de cuatro a seis semanas después del tratamiento. Esto se evidencia en el ensayo clínico Magnum, que ha resultado prometedor, seguro, factible y efectivo.

Figura 13. Regeneración celular con biomateriales y citocinas.
Parches de miocardio terapéuticos “listos para usar”
que contienen células madre, células derivadas y citocinas.



Tomada y modificada de Perez-Estenaga, 2018.

Medicina regenerativa en enfermedades ortopédicas

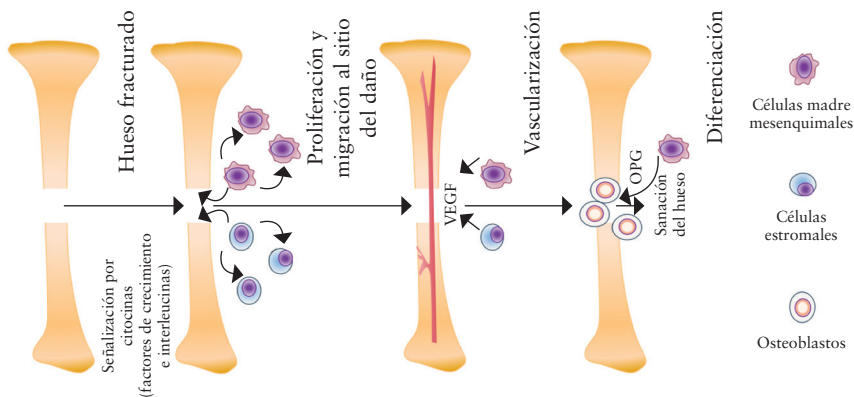
Las CMM han sido de gran importancia en la medicina regenerativa musculoesquelética debido a su capacidad para diferenciarse en tejidos estructurales conectivos, como el tejido óseo, y generar un proceso de reparación y regeneración ósea mediante la producción de biomoléculas osteogénicas. Las etapas de regeneración ósea *in vivo* comprenden: inflamación local, reclutamiento de CMM, diferenciación y fase de activación angiogénica (vascularización), esta última importante debido a que los nuevos vasos sanguíneos llevan oxígeno y nutrientes a la zona en proceso de regeneración que posee un metabolismo exigente. Por último, se da la osificación endocondral, que consiste en la formación del cartílago en la zona afectada, donde los condrocitos maduran hasta la hipertrofia y se autoinducen a apoptosis para conducir a la formación de hueso nuevo. Este proceso está regulado por vías de señalización coordinadas y activadas por el factor estimulante de colonias de macrófagos, el ligando del receptor activador del NF- κ B (conocido como RANKL), la OPG (osteoprotegerina, que inhibe la formación de osteoclastos) y el factor TNF- α .

Dependiendo de la fuente de donde sean aisladas las CMM, estas muestran diferentes ventajas. Hoy en día, la fuente para ingeniería de tejidos con más relevancia es el cordón umbilical (CU); muchas investigaciones han establecido que el CU es una fuente rica de citocinas, las cuales desempeñan una importante función en diferentes etapas de la reparación ósea. Por ejemplo, las citocinas IL-6, MCP-1 y MIP-1 intervienen en la fase inflamatoria. Las citocinas específicas —VEGF (regulador de angiogénesis), PDGF, FGF-2, etc.— ejercen como “factores de referencia” para reclutar CMM endógenas en la zona de la lesión (por medio de quimiotaxis); también ejecutan funciones relevantes en la proliferación, migración y diferenciación de las CMM en osteoblastos, contribuyendo a la vascularización y, por último, a la reparación tisular exitosa. Las citocinas pueden desencadenar vías de señalización ya sea paracrinas o autocrinas sobre CMM, células estromales y células endoteliales que regulan las respuestas inmunitarias, la inflamación, la remodelación de tejidos y la diferenciación celular (figura 14).

La reparación ósea es funcional si las CMM y las citocinas derivadas de CU se formulan de forma efectiva; esto es, por medio de un cuidadoso procesamiento de componentes celulares y no celulares en un aloinjerto crioconservado para intervenciones terapéuticas; por ejemplo, intervenciones en zonas de lesión ósea donde el aloinjerto ejerce un efecto sobre el microambiente del tejido y activa sus células residentes que participarán en varias etapas de la regeneración ósea; esto principalmente ha sido empleado en la fusión espinal (en trastornos de disco degenerativos), en las uniones no óseas (en cirugía de pie y tobillo) y en osteoartritis.

Para concluir, se ha verificado que los componentes no celulares poseen potenciales terapéuticos, lo que transforma la idea de terapia celular en terapia basada en la secreción, pues las citocinas son las encargadas de estimular y movilizar las células residentes del tejido favoreciendo el proceso de regeneración. Por tal razón, los exosomas o las microvesículas derivadas de CMM son centro de investigación para una futura terapia regenerativa sin células, pues se evitaría la transformación maligna y sería una alternativa más segura para el paciente.

Figura 14. Modelo que resume la acción molecular del producto derivado de la sangre del cordón umbilical en la regeneración ósea. Las citocinas inician las vías de señalización y activan las células madre del estroma y mesenquimales residentes para participar en la regeneración ósea.



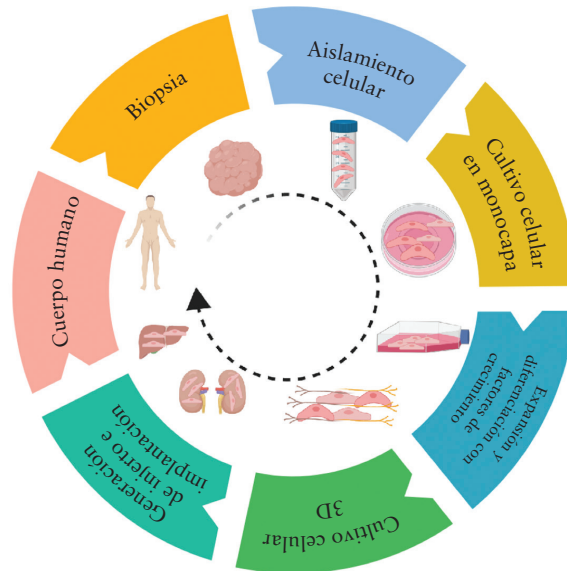
Tomada y modificada de Sane, 2018.

Medicina regenerativa en ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una ciencia que emplea CM, andamios (bio-materiales biocompatibles y biodegradables), factores de crecimiento específicos, citocinas y quimiocinas para mejorar, remplazar o regenerar tejidos y órganos (figura 15).

Figura 15. Materiales y procesos básicos necesarios para las tecnologías de ingeniería de tejidos.

Ruta general para llevar a cabo tecnologías de ingeniería de tejidos.



Tomada y modificada de Ude, 2018.

En la actualidad, los autoinjertos epidérmicos cultivados autólogos usados como sustitutos de piel, grupo heterogéneo de sustancias que ayudan en el cierre temporal o permanente de cualquier tipo de herida, han mostrado resultados insatisfactorios en cuanto a funcionalidad y estructura, debido a la contractura del injerto, cicatrices e infecciones. Por tal razón, los componentes dérmicos celulares derivados de CM representan una mejor opción debido a la presencia de fibroblastos que producen proteínas de la MEC, como colágeno, elastina, laminina y fibronectina; estos proporcionan una estabilidad mecánica a la dermis y regulan la función de las células en la epidermis, queratinocitos

y melanocitos, generando las tres capas de la piel: epidermis, dermis e hipodermis. También se ha investigado el uso de biomateriales (como andamios, por ejemplo, la fibrina, colágeno tipo 1, tropoelastina y carboximetilcelulosa de sodio), que han evidenciado un mejor comportamiento de los injertos en cuanto a vascularización y estratificación epidérmica.

El injerto de grasa autólogo se ha usado cada vez más en medicina regenerativa y estética. Para este propósito, el tejido adiposo que funciona como andamio se aspira de los depósitos de grasa subcutáneos del paciente, se purifica y luego se trasplanta al sitio deseado del cuerpo. Esto se ha aplicado a pacientes que sufren de asimetría facial, defectos radiados o heridas traumáticas; además, puede aplicarse en reconstrucción mamaria, cicatrización, enfermedad de Parry-Romberg, defecto del tejido blando glúteo, en el *pectus excavatum*, en secuela de infección por polio, dermatofibromatosis y en heridas isquémicas (pacientes con isquemia crítica de extremidades y úlceras crónicas). En estos casos, hay aumento de angiogénesis y linfangiogénesis; y disminución de la fibrogénesis y respuestas inflamatorias.

A nivel preclínico, se ha demostrado la efectividad de las CMM en regeneración de lesiones de piel (inyectadas en la zona de lesión y alrededor), al promover la reparación, la regeneración de las quemaduras térmicas y la exposición a la radiación. Esto se ha evidenciado en el cierre de la herida, la disminución de la posibilidad de infección, la generación e incremento de vasculogénesis, el aumento de elasticidad y la reducción de la formación de cicatrices en un período corto de tiempo.

Varios estudios han desarrollado sustitutos de piel a partir de CMM autólogas productoras de colágeno con el fin de remplazar las dos capas superiores de la piel (la epidermis y la dermis). Al ser un tratamiento de tipo autólogo, se evita el uso de sustitutos extraños, disminuye la probabilidad de infección, evita la utilización de inmunosupresores y disminuye el número de cirugías.

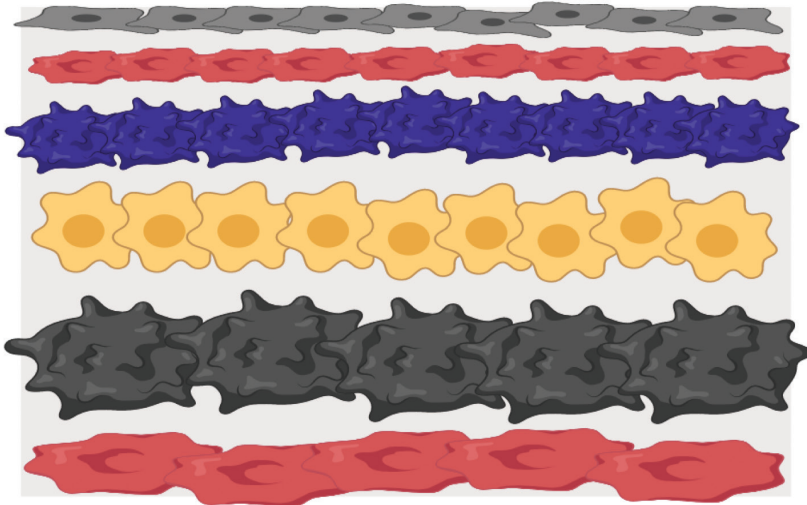
Otros científicos emplean el dispositivo de aerosol ReCell Spray para la piel, con el cual se distribuyen sobre las heridas CM sanas, autólogas, con capacidad de proliferación y suspendidas en una solución fisiológica, después de la eliminación de las células muertas.

En todos estos métodos, se debe tener en cuenta la formación de capas celulares de la piel, desarrolladas a partir de CM de un paciente con el fin de cultivar nuevos tejidos (figura 16).

Respecto a la regeneración de otros tejidos, se ha visto que las CMM y las CMA pueden generar células de vástago y cono de la retina, proporcionando una mejora esencial en la restauración de la visión. Efectos similares se han observado en el oído, donde el trasplante de CM demuestra una regeneración parcial de las células ciliadas de la cóclea las cuales carecen de capacidad regenerativa. Hasta el momento, no se ha restablecido la audición total, ya que no se ha logrado la integración de las células ciliadas en la red de innervación que permite la restauración viable de la función auditiva. También se han podido construir testículos intactos usando CM autólogas; estos testículos son capaces de producir espermatozoides. Además, la ingeniería tisular ofrece la posibilidad de reconstruir órganos genitourinarios.

Figura 16. Formación de capas de la piel.

Representación esquemática de la formación de tejido mediante la estratificación de las células en un andamio tridimensional para imitar la disposición natural de las capas de la piel.



Tomada y modificada de Ude, 2018.

Aplicaciones de células madre en clínica

Las CM se constituyen en vehículos terapéuticos de genes en el caso de enfermedades monogénicas y alivian los trastornos inmunitarios debido a su capacidad para inmunorregular las respuestas inmunológicas.

Células madre en enfermedades autoinmunes

La artritis reumatoide y la artritis idiopática juvenil son condiciones caracterizadas por abundante secreción de citocinas inflamatorias y autoanticuerpos, debido a una alteración en la tolerancia y la respuesta inmune frente a antígenos de tejidos propios; en estas dos condiciones, los tratamientos convencionales se basan en fármacos que solo modifican la enfermedad. La terapia consiste en administrar CM derivadas de MO junto con medicamentos antivirales e inmunoglobulina, para evitar infecciones frecuentes hasta que el sistema inmunitario vuelva a su capacidad máxima; la terapia ha mostrado respuesta positiva significativa. En otras investigaciones en las que las CMM fueron inyectadas, se observó expansión de células Th1/Th17 específicas del antígeno junto con una disminución en la secreción de quimiocinas inflamatorias y citocinas. Se destacó el incremento de secreción de IL-10, que es un interleucina antiinflamatoria relevante en la activación de linfocitos T reguladores (Treg) que controlan las células T autorreactivas y mejora la tolerancia periférica *in vivo*. Sin embargo, en algunos casos se observó que la administración de CMM solo fue efectiva al inicio de la enfermedad, debido a que perdieron propiedades inmunorreguladoras al ser expuestas a microambientes inflamatorios.

En el caso del lupus eritematoso sistémico (LES) —condición autoinmune caracterizada por una inflamación multisistémica producida muchas veces por la liberación de complejos inmunes con células CD34⁺ que sufren apoptosis—, el tratamiento por lo general está basado en fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antimaláricos, corticosteroides y factores citotóxicos; estos tratamientos producen efectos secundarios graves, además de frecuentes recaídas. El trasplante autólogo de CMH disminuye el número de células CD34⁺. El trasplante alogénico

de CMH es recomendable en pacientes que padecen LES persistente que afecta los órganos a pesar del tratamiento farmacológico estándar.

Por otra parte, el trasplante autólogo de CMH en esclerosis sistémica (ssc) prolonga la esperanza de vida de los pacientes al mejorar la flexibilidad de la piel y detener la afectación pulmonar. La terapia convencional consiste en administrar la combinación de angiotensina y ciclofosfamida para minimizar los efectos producidos por la activación de las células T, que conduce a la generación de autoanticuerpos, la liberación de citocinas y la excesiva producción y deposición de colágeno.

Otra enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple (EM), caracterizada por la activación de los linfocitos T contra los componentes estructurales de la mielina, lo que conduce a la degeneración de los axones neuronales y se produce así una reacción inflamatoria que promueve la fisiopatología de la EM. Existen dos tipos de EM: la progresiva primaria, que es resistente al tratamiento farmacológico y es de difícil recuperación; y la EM progresiva secundaria, que presenta episodios de mejoría, pero también recaídas. El trasplante autólogo de CMH retrasa el progreso de la EM en pacientes que han mostrado falla terapéutica; se sugiere que las CMH se diferencian y reemplazan las neuronas dañadas.

Con respecto a las citopenias autoinmunes, se destaca la púrpura trombocitopenia inmune (PTI), patología que se caracteriza por la disminución crónica del nivel de plaquetas en sangre ocasionada por los autoanticuerpos. El tratamiento común se basa en la administración de fármacos inmunosupresores, que pueden generar mielosupresión como efecto secundario. El trasplante de CMH restaura los parámetros hematológicos y disminuye el número de células autoinmunes, que evidencian que las CMH aceleran el equilibrio hematológico en comparación con las terapias convencionales.

Otra enfermedad autoinmune es la diabetes mellitus (DM) tipo 1, causada por células del sistema inmunitario que atacan las células β pancreáticas, secretoras de insulina, lo que provoca un aumento de glucosa en sangre. Se sugiere que el trasplante de CM puede regenerar los islotes pancreáticos, y así normalizar la secreción de insulina y regular los efectos inmunomoduladores. También se ha documentado que el trasplante autólogo de CMH en pacientes con DM tipo 1 mejora

la funcionalidad de las células β pancreáticas para mantener una glicemia normal; además, se han evidenciado mejoras en los resultados combinando el trasplante de CM con fármacos, debido a que se logra la independencia de la insulina exógena. Pacientes tratados con trasplante de CMM derivadas de tejido adiposo han mostrado una reducción en el requerimiento de insulina, sin presentar efectos secundarios.

Por último, en la enfermedad de Crohn (EC), los linfocitos T ayudadores tipo 1 pierden tolerancia inmunológica afectando el tejido gastrointestinal. La terapia de CM es segura y ha mostrado una alta eficiencia; junto con la terapia farmacológica, reduce el dolor abdominal y disminuye los síntomas. Para el tratamiento con CM, se suelen utilizar CMM y CMH.

Células madre en tratamiento de cáncer

En la actualidad, los tratamientos para cáncer no representan una solución definitiva, debido a la frecuencia de pacientes que experimentan recaídas y metástasis. Las CM se han constituido en un vehículo de terapias antitumorales o antiangiogénicas. Un problema importante en el uso de terapia de CM en cáncer es que si no existe un control y un equilibrio adecuados en el tratamiento, es posible promover el crecimiento tumoral.

Para el cáncer de mama se ha ensayado el trasplante alogénico de CMH, debido a la ineffectividad e inespecificidad que exhiben la terapia hormonal, la quimioterapia y la radioterapia. El trasplante ha mostrado eficiencia en metástasis, ya que logra disminuir la incidencia de recaídas y tiene un efecto citorreductor.

En el caso del cáncer de próstata, las células madre cancerosas (CMC) han facilitado el estudio de la quimiorresistencia, ya que permiten ser objetivos para nuevas intervenciones terapéuticas; esto se debe a que exhiben capacidades de autorrenovación, de propagación de tumores y de falta de (o deficiente) expresión del receptor de andrógenos, que son características de células preexistentes resistentes a la terapia de privación de andrógenos, que dan lugar al cáncer de próstata resistente a la castración.

En pacientes con cáncer colorrectal que recibieron un trasplante alogénico de CM de intensidad reducida (RIST), un estudio evidenció aumento en la respuesta tumoral y disminución de lesiones metastásicas macroscópicas, lo que sugiere que el trasplante alogénico de CM logra promover la generación de linfocitos T antineoplásicos.

Otra investigación con resultados alentadores se da en el cáncer de células renales. En formas metastásicas es recomendable el trasplante alogénico de CMH junto con la infusión de linfocitos inmunosupresores, pues suprime los efectos del injerto contra el tumor, disminuyendo así la metástasis y extendiendo la duración de la supervivencia; resultados similares se han obtenido con los aloinjertos, que se han asociado con el nivel de proteína C reactiva, el estado de rendimiento y el nivel de lactato deshidrogenasa.

El cáncer de pulmón también ha sido fuente de interés; se ha utilizado el trasplante alogénico de CM, que mejora la tasa de supervivencia y evita la recaída. El trasplante autólogo de CMH suministrado junto con la quimioterapia resulta útil en el tratamiento del carcinoma de pulmón de células pequeñas; se ha podido evidenciar la reducción de efectos secundarios de la quimioterapia, específicamente la mieloablación. Esto sugiere que las CMH ejercen efectos terapéuticos sobre el tumor, desencadenan la supresión de los efectos del injerto contra el tumor y aumentan la supervivencia.

Por último, en la leucemia y en el linfoma, dos tipos de cáncer de la sangre generados por la proliferación descontrolada de leucocitos, se han hecho tratamientos clínicos con CMH provenientes de un donante compatible y con antígenos de leucocitos humanos similares en la superficie celular. El RIST también se ha utilizado como tratamiento para lograr la recuperación completa de pacientes con leucemia, en especial si se utiliza un donante compatible con el antígeno leucocitario humano. Es importante aclarar que existe un obstáculo frente a los trasplantes alogénicos de CMH y es la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD); sin embargo, se han realizado varios esfuerzos para reducir la frecuencia de GVHD y así disminuir la tasa de mortalidad en forma significativa.

Células madre en enfermedades neurodegenerativas

Las CM también se han utilizado en el tratamiento de varios trastornos neurológicos, como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson (EP), lesiones de la médula espinal, enfermedad de Huntington, accidentes cerebrovasculares, distrofia muscular de Duchenne, insuficiencia cardíaca, enfermedades de la superficie ocular, reparación de cartílago y enfermedad hepática. Por otro lado, el cerebro es el órgano más desafiante que puede utilizar terapias basadas en CM, debido a su alta complejidad funcional y estructural; por tal razón, muchos trastornos neurológicos degenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, implican más de un tipo de célula.

En lesiones de la médula espinal, la implantación de CMM evidenció la transformación de macrófagos tipo 1 (M1) a tipo 2 (M2) y efectos antiinflamatorios que conllevaron una remodelación del tejido y disminución del tejido cicatricial. No se observaron eventos adversos de importancia, solo fiebre leve y dolor muscular; además, se observó una restauración de las funciones motoras en pocos meses.

También se ha investigado el uso de células madre en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), una enfermedad neurodegenerativa que afecta las neuronas motoras alterando la funcionalidad muscular. En investigaciones realizadas, se inyectaron CMM aisladas de MO de forma autóloga en la médula espinal de los pacientes con ELA; los seguimientos durante 3 y 6 meses no reportaron cambios estructurales en la médula espinal ni proliferación de células anormales; pero si se presentaron eventos adversos leves, como irradiación del dolor intercostal y disestesia sensorial de la pierna, síntomas que desaparecieron a las pocas semanas; además, hubo mejora del fenotipo patológico y un incremento del número de conexiones neuromusculares.

Otra condición investigada ha sido la enfermedad de Parkinson (EP), cuya característica predominante es la pérdida sucesiva de neuronas dopaminérgicas. Gracias a la secreción de factores tróficos —como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el FGF-2, el EGF, la neurotrofina-3 (NT-3) y el BDNF— se ha demostrado que el trasplante de las CMM ejerce efectos neuroprotectores sin diferenciarse a neurocitos. Hoy en día se realizan nuevas estrategias, como las modificaciones

genéticas de las CMM, que inducen la secreción de factores específicos o aumentan la diferenciación de las células de dopamina (DA). La administración de CMM se realizó por vía nasal, en pacientes que padecen EP; cuatro meses después de la administración, se encontraron CMM en diferentes regiones del cerebro —como el hipocampo, el cerebro, el tronco cerebral, el lóbulo olfativo y la corteza—, lo que sugiere que las CMM podrían sobrevivir y proliferar *in vivo* con éxito.

Por último se encuentra la enfermedad de Alzheimer (EA), una condición neurodegenerativa en la que la demencia, la pérdida de memoria y la discapacidad intelectual se constituyen en los síntomas más comunes. En la EA, los tratamientos con CMM modifican el entorno inflamatorio activando la microglia y conduciendo al incremento de la expresión de las enzimas de degradación del péptido β -amiloide; además, reducen la secreción de citocinas proinflamatorias y activan los linfocitos T reguladores (Treg). En otros estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha evidenciado una mejora en la vía de autofagia celular, lo que conduce a la eliminación de la placa amiloide y al aumento de la capacidad de supervivencia neuronal.

Aplicaciones de las células madre en investigación

Los estudios con células madre han permitido investigar sobre usos terapéuticos de diferentes compuestos y también identificar métodos de diferenciación de células; como por ejemplo, inducir la formación de condrocitos. En investigación aplicada, se han utilizado modelos biológicos para observar los efectos y mecanismos de acción de CM trasplantadas. Un ejemplo es el trasplante de CM derivadas de MO, que permite la regeneración de cardiomiocitos en corazones lesionados de ratones mejorando su función cardíaca, y permitiendo inferir reparación del miocardio y secreción de factores que promueven la proliferación de las células del tejido. Caso similar se observó en el trasplante de CM aisladas de la membrana sinovial en ratones mutados con distrofia muscular de Duchenne, donde se evidenció el potencial miogénico, con la mejoría de la función y estructura del músculo. Hoy en día se realizan ensayos clínicos fase III con CMA en enfermedades cardiovasculares; se ha evidenciado que no todos los casos son

totalmente efectivos y que hay una posibilidad de inducción de tumores, dependiendo del número de células aplicadas.

Investigación como modelo cardiovascular

Como modelo para estudiar enfermedades cardiovasculares se han tomado los cardiomiocitos derivados de animales y CMPi humanas. Las CMPi reflejan un genotipo único, ya que son derivadas de células somáticas de un paciente, son de origen humano, son pluripotentes y pueden aplicarse de forma autóloga en usos clínicos. Debido a sus características, han permitido la comprensión de cardiomiopatías, trastornos del ritmo, trastornos valvulares y vasculares, y de los factores de riesgo metabólicos de la cardiopatía isquémica, por medio del modelado de enfermedades a través de la reprogramación celular y edición genética. Varias patologías humanas —como el síndrome de QT largo (LQTS), el síndrome de Brugada, el síndrome de Timothy (también llamado LQT-8) y la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT)— se han modelado con CMPi, imitando fenotipos cardíacos observados en pacientes. Sin embargo, un obstáculo es que, al ser un tipo de CM, las CMPi presentan inmadurez, por lo cual no se reflejan la fisiología y la fisiopatología real. Por ejemplo, muestran un tamaño relativamente pequeño, excitabilidad eléctrica reducida, mecanismos de acoplamiento de excitación-contracción ineficientes y una respuesta adrenérgica incompleta.

Por su parte, los cardiomiocitos derivados de animales han resultado de gran utilidad. Hay que tener en cuenta que las características funcionales y moleculares varían de humanos a animales, como por ejemplo las corrientes de iones cardíacos y el metabolismo energético; esto hace que no exista un modelo exacto que permita ver la acción de los cardiomiocitos humanos frente a enfermedades y situaciones de estrés, lo que se constituye en obstáculo para la transpolación clínica de los hallazgos basados en dichos modelos.

Los cardiomiocitos derivados de las CMPi de pacientes enfermos han demostrado éxito por reflejar el estado fisiopatológico, pero poseen ciertas limitaciones respecto a los métodos de aislamiento debido a la vulnerabilidad enzimática y la susceptibilidad a la hipoxia, lo que

causa cambios en la estructura y remodelación celular, con el consiguiente deterioro fisiológico.

Investigación en modelado de órganos

Para comprender de una manera precisa y real la fisiología y la fisiopatología de los órganos y tejidos, los investigadores han desarrollado en los últimos tiempos cultivos 3D (modelos organoides) con CM (CMPi o CME) imitando el cerebro, la retina, el estómago, intestino delgado, pulmón, tiroides, hígado, páncreas y riñón. Los organoides se componen de distintos tipos de células y se autoorganizan de manera similar a un órgano *in vivo*, permitiendo el estudio de enfermedades infecciosas, trastornos hereditarios, toxicofarmacología, tumorigénesis y trasplante de órganos. A pesar de su gran utilidad, muestran limitaciones; como no poseer innervación, vascularización y sistema inmunológico, por lo que una patología no se reproduciría de forma completa. Sin embargo, permiten un avance en cuanto a entorno biomimético en comparación con los cultivos de CM convencionales y modelos animales debido a que carecen de interferencias, como las diferencias entre especies y la heterogeneidad humana.

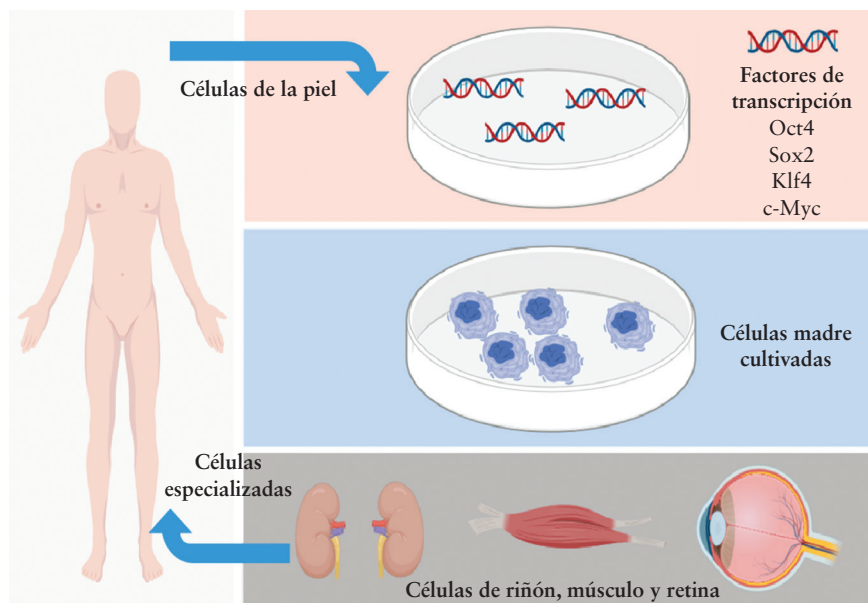
Investigación en CMPi

Las CMPi poseen un alto potencial de diferenciación y proliferación; son seguras a nivel inmunológico y tumorigénico en el trasplante autólogo y alogénico, y su diferenciación es controlada y escalable. Se pueden convertir en CMM inducidas, que mejoran la regeneración de tejidos como vasos sanguíneos, hígado, corazón, condrocitos, músculo esquelético y piel.

Las CMPi se han logrado aislar de células de piel y se han inducido mediante FT para trasplantarlas de forma autóloga en el ojo con el fin de restaurar parcialmente la visión perdida (figura 17). Además, se ha demostrado la posibilidad de un trasplante alogénico sin eventos adversos y con resultado positivos; por último, se ha logrado la producción de un diente funcional y completo a partir de CMPi derivadas de riñón de un modelo murino.

Figura 17. Generación de CMPi.

Diagrama esquemático de la creación de CMPi a partir de células de la piel.



Tomada y modificada de Ude, 2018.

Las CMPi han sido centro de investigación para el estudio de exosomas secretados (vesículas extracelulares) que se constituyen en nanopartículas envueltas por una bicapa lipídica que son liberadas como respuesta al microentorno. Estas vesículas envían sus señales a la célula objetivo produciendo cambios fisiológicos en esta, por medio de ácidos nucleicos, lípidos, mitocondrias y proteínas. Los exosomas son recolectados de los sobrenadantes del cultivo de CMPi mediante ultracentrifugación. Investigaciones revelan que, en piel, aumentan el crecimiento y la proliferación de queratinocitos y fibroblastos, reduciendo el área de lesión. Además, estimulan la secreción de fibronectina y colágeno por parte de queratinocitos y fibroblastos, y el aumento de la expresión de genes relacionados con la cicatrización de heridas de la piel, como el colágeno tipo 1, la elastina y la metaloproteína 1 de matriz (MMP1). Por su parte, el secretoma de CM contiene varias biomoléculas que contribuyen a la reparación del tejido.

Por último, al tener la posibilidad de ser diferenciadas en distintos linajes celulares, las CMPi permiten la comprensión a profundidad del proceso de diferenciación de los progenitores y la patogénesis de múltiples enfermedades, como por ejemplo, la enfermedad de Huntington; de enfermedades óseas y del cartílago, como la fibrodisplasia osificante progresiva y la acondroplasia, utilizando las CMPi derivadas de la enfermedad.

Investigación en el desarrollo de fármacos

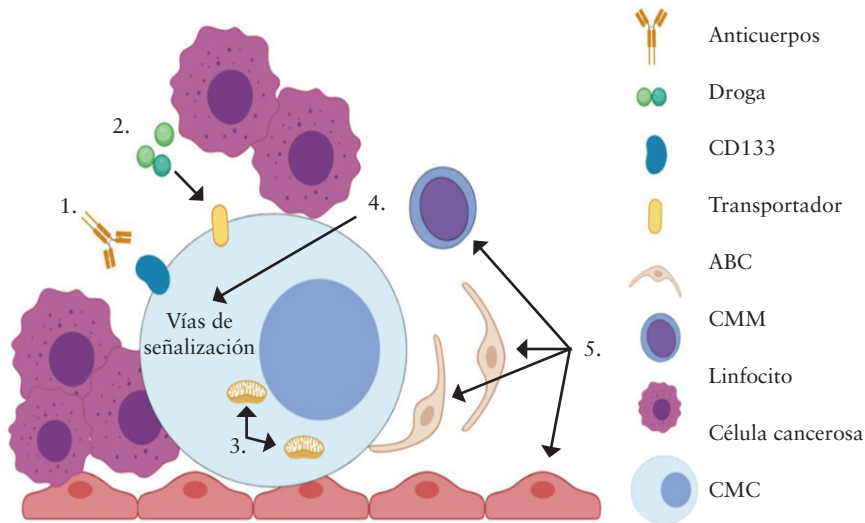
En la investigación sobre toxicidad en el desarrollo de fármacos, las CMPi permiten realizar pruebas clínicas y predecir con más precisión reacciones adversas; esto, gracias a que reflejan gran variedad de orígenes genéticos y requieren pequeñas cantidades de muestra, como ocurre con los cardiomiocitos derivados de CMPi que, bajo condiciones de cultivo celular, sobreviven durante períodos prolongados.

Por su parte, las células madre cancerosas (CMC) contribuyen a una mejor comprensión de la recurrencia del tumor y de la resistencia a las terapias convencionales contra el cáncer, permitiendo ensayar nuevos fármacos y descubrir así nuevos blancos terapéuticos. Es importante buscar una mayor identificación de CMC para diversos enfoques terapéuticos en el futuro; un ejemplo es la terapia de diferenciación. También es importante resaltar que se requiere una interpretación profunda de la relación entre CMC y el microambiente tumoral, con el fin de establecer objetivos terapéuticos apropiados que alteren el microentorno y, en consecuencia, el tumor, en busca de una terapia exitosa (figura 18).

Investigación en producción de biosensores

Las CM permiten la producción de biosensores basados en tejidos y biosensores de base biológica, que tienen la capacidad de detectar riesgos químicos o biológicos que puedan llegar a causar consecuencias agudas o crónicas, irritaciones, incapacidad o muerte (enfermedades genéticas o cáncer).

Figura 18. Posibles estrategias terapéuticas para la eliminación de CMC. (1) Dirigirse a biomarcadores de proteínas de superficie como CD133 con el objetivo de desarrollar terapias específicas para CMC. (2) Inhibir el papel de los transportadores de flujo de salida para reducir la resistencia a los medicamentos contra el cáncer. (3) Reprogramar las CMC a un estado normal alterando su metabolismo e induciéndolas a diferenciarse. (4) Inhibir las vías esenciales para la proliferación de CMC, como la vía de señalización Wnt/ β -catenina. (5) Afectar el nicho vascular para alterar los mecanismos microambientales que regulan el mantenimiento y la función de la célula madre germinal (CMG).



Tomada y modificada de Hawsawi, 2018.

Los biosensores se pueden clasificar en dos grupos: 1) los que tienen elementos detectores derivados de células animales superiores y 2) aquellos con elementos detectores derivados de organismos simples (bacterias y levaduras). Los sensores de base biológica utilizan componentes biológicos como elementos de detección, que son compatibles con la transducción química, eléctrica u óptica. Sus elementos detectores incluyen tejidos cerebrales de mamíferos, cultivos de células neuronales y gliales, cultivos de médula espinal, cultivos de cardiomiocitos y cultivos de hepatocitos.

Otras investigaciones

En la actualidad, hay información de que existen investigaciones para generar *sangre sintética*, producida a través de un proceso llamado *blood pharming*, un método para producir glóbulos rojos genéticamente modificados a gran escala a partir de CM de cordón umbilical, y empleando un equipo que imita la función y estructura tridimensional de la MO. También se ha informado acerca de la producción en masa de plaquetas a partir de CMPi.

Por otra parte, está la iniciativa de encapsular células madre en un gel de alginato hecho de algas que les ofrece protección contra el medio ambiente. Se encontró que de esta forma las CM podían ser viables hasta por tres días. Este nuevo invento resultaría de vital importancia para los militares, para el tratamiento rápido y la curación de lesiones, quemaduras y laceraciones sufridas.

Por último, las células endoteliales (CE) resultan de utilidad en el modelado de enfermedades, la detección de fármacos, terapia celular e ingeniería de tejidos. Estas células se pueden obtener por medio de CMPi, las cuales tienen una capacidad de proliferación ilimitada y pueden diferenciarse a través de un cuerpo embrionario. Las CE derivadas de CMPi pueden proporcionar fuentes de células ilimitadas para las aplicaciones requeridas.

Biorreactores en la expansión de CMPi

La diversidad de fuentes de CM y sus respectivas condiciones de cultivo indican que no existe un sistema de biorreactor universal para todas las CM, por lo cual se deben diseñar biorreactores según los requerimientos, regulando con precisión el microambiente celular. Las principales diferencias en los diseños de biorreactores se pueden asociar con diversos temas: con la transferencia de masa, con los esfuerzos de cizallamiento o esfuerzo cortante (desarrollando formas para mejorar la transferencia de masa sin aumentar la velocidad de flujo o mediante los cuales se puede lograr la estimulación mecánica conservando la estructura celular), con la capacidad de soportar estructuras de cultivo 3D (organoides) o, incluso, con el propósito final (investigación frente a gran escala y aplicaciones clínicas). La variabilidad

en los resultados y la falta de estandarización representan en la actualidad un reto para la investigación.

En última instancia, el bioprocesamiento de CM requerirá el diseño e integración de diferentes procesos (expansión, diferenciación y crioconservación de CM) y de sistemas que serían específicos de la aplicación; esto con el fin de lograr un producto clínicamente relevante a través de un bioproceso regulado y controlado, que sea reproducible, estandarizado, automatizable (cuando sea necesario), integrado y certificado. En consecuencia, el diseño de dichos sistemas específicos de la aplicación o la ampliación de un sistema para producir el número de células necesario requieren un conocimiento de las características de impulso y transporte masivo del sistema en diversas condiciones operativas, lo que también será de utilidad para la posterior operación exitosa del sistema.

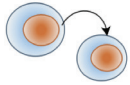
Los parámetros fisicoquímicos de cultivo incluyen: pH, oxígeno disuelto, y tensiones y temperatura del dióxido de carbono. Las concentraciones de nutrientes y metabolitos determinan el crecimiento celular, la diferenciación y la muerte en un cultivo; por lo tanto, deben controlarse con detenimiento en un bioproceso. Las interacciones entre la expresión de los genes que codifican para los factores de crecimiento con otros parámetros del proceso, en muchos casos, no se entienden en su totalidad. Por lo tanto, es crucial cuantificar y calificar estos efectos y sus interacciones entre sí para adaptar el proceso de cultivo a la producción óptima de una población de tipo celular específico.

Los principales desafíos de uso de biorreactores para este fin incluyen: selección de la fuente celular (alogénica versus autóloga); producción de gran número de células (cantidad); control de células; diferenciación para generar solo las poblaciones celulares requeridas (pureza) y asegurar el fenotipo deseado; potencia y función (calidad); y una formulación eficiente, para almacenamiento, entrega y administración.

El destino de las CM es altamente dependiente de las señales que se encuentran en el ambiente extracelular. Estas señales operan en diferentes escalas temporales y espaciales, impulsan destinos celulares específicos y, en última instancia, promueven y controlan la autorrenovación celular, la diferenciación y la apoptosis. Se sugieren como

las señales más relevantes que rigen el destino de las CM: la MEC, los factores solubles, las interacciones célula-célula, las fuerzas físicas y los factores fisicoquímicos (figura 19).

Figura 19. Factores ambientales y parámetros de bioprocesamiento que impactan en las decisiones de destino de las CM (inactividad, autorrenovación, diferenciación y apoptosis)

Factores ambientales			Parámetros de bioproceso	Destino de CM
Matriz extracelular	Substratos naturales y sintéticos Proteínas recombinantes Capas de alimentación		Composición de la matriz, orientación y estructura. Mecánica del sustrato	Quiescencia 
Factores solubles	Factores de crecimiento y diferenciación Moléculas pequeñas		Composición del medio, concentración de suplementos y modo de operación del cultivo	Autorenovación 
Interacción célula-célula	Comunicación yuxtacrina Señalización paracrina y endocrina		Concentración celular, tamaño de la colonia, cocultivo, topografía	Apoptosis 
Factores físicos	Hidrodinámica Compresión y/o tensión Fuerza centrífuga Presión hidrostática		Tipo de mezcla, tasa de agitación y tasa de perfusión	Diferenciación 
Ambiente fisicoquímico	Nutrientes y metabolitos Temperatura pH Oxígeno Tensión		Modo de operación del cultivo, metabolismo, composición del aire y tasa de aireación	

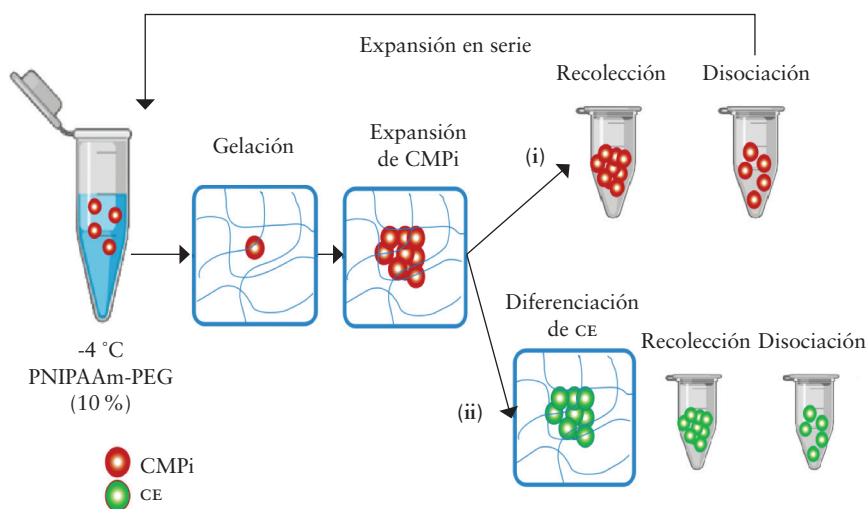
Tomada y modificada de Serra, 2012.

Un ejemplo sencillo del uso de biorreactores en la expansión de CMPi es el diseño de un método que emplea un hidrogel termorreversible en 3D como andamio, el cual cuenta con varias ventajas, como proteger las células del estrés hidrodinámico en el recipiente de cultivo evitando

que las células se aglomeren en exceso. Esto conlleva una alta eficiencia del cultivo en cuanto a viabilidad celular, tasa de crecimiento, rendimiento y pureza. El método se describe de la siguiente manera: las CMPi individuales se suspenden en un 10 % de una solución líquida de polímero PNIPAAm-PEG a baja temperatura (4°C). Luego se realiza la solidificación elevando la temperatura a 20°C - 37°C durante cinco minutos; y la solución de polímero forma una matriz de hidrogel elástica que encapsula las CMPi. Después de 4-5 días de cultivo, las CMPi se expanden clonalmente en agregados de células esféricas (esferoides) con un tamaño muy uniforme. El hidrogel pasa a estado líquido a baja temperatura (4°C) con el fin de recolectar las CMPi y emplearlas en una siguiente expansión; cuando se obtenga la cantidad requerida de CMPi, se pueden diferenciar en células endoteliales (CE) o en la célula deseada (figura 20).

Figura 20. Ilustración del bioprocesamiento.

Descripción esquemática del uso de CMPi en la producción de CE usando un hidrogel termosensible: (i) Cuando se alcanza el número de CMPi objetivo. (ii) Las CMPi se diferencian en CE en el hidrogel.



Tomada y modificada de Lin, 2018.

Para diferenciarlas a células endoteliales (CE), una vez expandidas se cambia el medio de expansión por el de diferenciación. Las CMPi individuales ($\sim 4 \times 10^6$ células) se mezclan con 4 ml de solución de PNIPAAm-PEG al 10 % a 4 °C y se inyectan en medio E8 a temperatura ambiente, al interior de un biorreactor cerrado, estéril e incubado a 37 °C y 5 % de CO₂. Se forman hidrogeles fibrosos en forma instantánea, con CMPi individuales distribuidas de modo uniforme en los hidrogeles. Las células se cultivan en medio E8 durante 5 días, seguidos de otros 5 días adicionales en medio de diferenciación de CE. El medio se almacena en una bolsa permeable a los gases y se perfunde continuamente en el biorreactor. En el día 10, los andamios de hidrogel se licuan y los esferoides celulares se sedimentan mediante centrifugación a 100 revoluciones durante 5 minutos. Los esferoides se disocian en células individuales mediante el tratamiento con Accutase (solución de desprendimiento de células de enzimas proteolíticas y colagenolíticas para el desprendimiento de rutina de las células) a 37 °C durante 10 min. Se producen cerca de 8×10^7 CE. Se debe determinar la viabilidad por medio de tinción de células vivas/muertas. Además, se realiza una inmunotinción con el fin de determinar los marcadores específicos de CE: PECAM-1 y VE-cadherina; no se deben detectar marcadores Oct3/4 y Nanog que corresponden a CMPi no diferenciadas (figura 21).

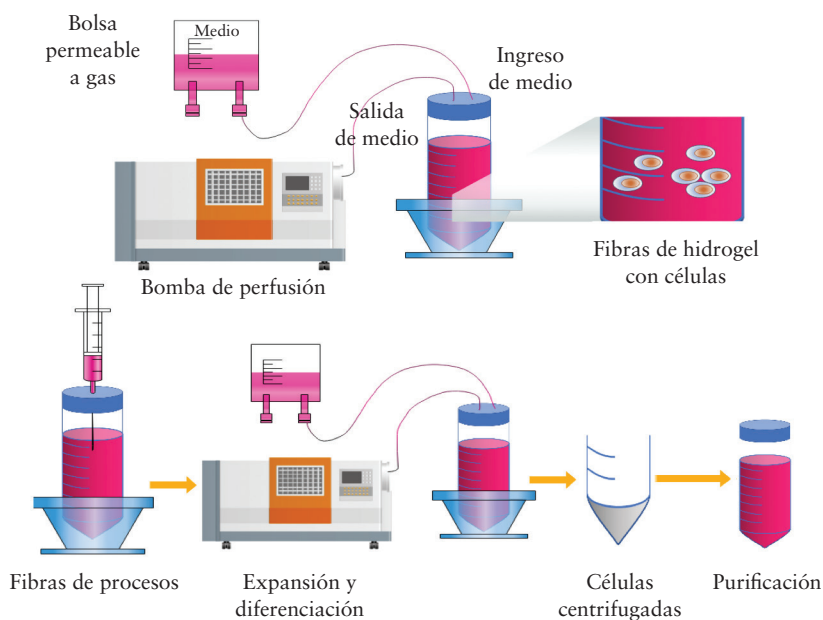
Las CE derivadas de CMPi en cultivos 3D poseen características como la capacidad para captar lípidos y formar redes vasculares (angiogénesis); y en cocultivo con células musculares lisas vasculares, tienen la capacidad de organizarse en estructuras altamente definidas. También expresan algunos genes específicos de CE, incluidos los marcadores de superficie (CD31, CD144, VWF y CD34), factores de crecimiento (VEGF-A, VEGF-B y VEGF-C) y MEC.

Las CE también se pueden cultivar en 2D, en donde se ha reportado que la mayoría de los genes expresados están relacionados con los procesos del ciclo celular mitótico y el desmontaje de MEC. Los análisis diferenciales de la expresión génica identificaron 919 genes regulados al alza en CE cultivadas en 3D y 718 genes regulados al alza en CE cultivadas en 2D. Los genes enriquecidos en CE cultivadas 3D se encuentran relacionados con la vasculatura, el ensamblaje de MEC, la adhesión celular, la glucólisis y la señalización de efrina y Notch.

Se concluyó que el tipo de cultivo influyó en la expresión génica y en el fenotipo de las células; las CE cultivadas en 2D adoptaron un fenotipo proliferativo, mientras que el entorno 3D promovió la morfogénesis vascular (tabla 8).

Figura 21. Un prototipo de biorreactor.

El biorreactor consta de una bomba para perfusión del medio, una bolsa de plástico permeable al oxígeno para el medio de almacenamiento y un recipiente cerrado (por ejemplo, un tubo cónico de 50 ml), donde se suspenden las fibras de hidrogel con células. El día 0 se mezclan CMPi individuales con solución PNIPAAm-PEG al 10 % a 4° C y se inyectan en el medio E8 a temperatura ambiente en el recipiente. Los hidrogeles fibrosos se forman de inmediato. Las células se cultivan en el medio E8 durante 5 días, seguidos de otros 5 días en medio de diferenciación para CE. El medio es perfundido en forma continua. El día 10, el andamio de hidrogel se licua, y los esferoides se sedimentan por centrifugación. Los esferoides se disocian en células individuales, las cuales son purificadas.



Tomada y modificada de Lin, 2018.

Tabla 8. Cuadro comparativo de la expresión génica de CE.

Vías de señalización y expresión de genes en CE cultivadas en configuraciones 2D y 3D.

Genes CE cultivadas en 2D	Genes CE cultivadas en 3D
Colágeno	Colágeno
Laminina	Laminina
Integrina	Integrina
Componentes de MEC	Componentes de MEC
Proteasas	Proteasas
Genes para el ciclo celular y la proliferación (CXCL1, CCL7, CXCL10, TGFA, CTGF, CXCL2, CXCL6, HGF, CXCL11, CCL2, TIMP2, IL-8 y BMP6).	Genes involucrados en los procesos de glucólisis, desarrollo de la vasculatura, angiogénesis, señalización de hipoxia, efrina, señalización Notch
	Señalización Wnt (MMP9, IGF1, TNFRSF10C, VEGF-A, CCL5, IGFBP1, IGFBP2, IL6, CXCL16, ANGPT1, FGF10, ANGPT2, IL-1B, VEGF-B y ANG)

Bibliografía consultada

- Cable, J., Fuchs, E., Weissman, I., Jasper, H., Glass, D., Rando, T. A., Blau, H., Debnath, S., Oliva, A., Park, S., Passequé, E., Kim, C. y Krasnow, M. A. (2020). Adult stem cells and regenerative medicine: a symposium report. *Ann N Y Acad Sci.*, 1462(1), 27-36. <https://doi.org/10.1111/nyas.14243>
- Hawsawi, Y. M., Al-Zahrani, F., Mavromatis, C. H., Baghdadi, M. A., Saggi, S. y Oyouuni, A. A. A. (2018). Stem cell applications for treatment of cancer and autoimmune diseases: its promises, obstacles, and future perspectives. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 17. <https://doi.org/10.1177/1533033818806910>
- Labusca, L., Herea, D. D. y Mashayekhi, K. (2018). Stem Cells as Delivery Vehicles for Regenerative Medicine: Challenges and Perspectives. *World Journal of Stem Cells*, 10(5), 43-56. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i5.43>
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M. y Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep.*, 16(1), 3-32. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>

- Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G. J. y Sánchez-Monroy, V. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatol. Reprod. Hum.*, 27(3), 194-199.
- Ntege, E. H., Sunami, H. y Shimizu, Y. (2020). Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. *Regen Ther*, 14, 136-153. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.01.004>
- Perez-Estenaga, I., Prosper, F. y Pelacho, B. (2018). Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and Biomaterials: The Perfect Match for Cardiac Repair? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103236>
- Serna-Cuéllar, E. y Santamaría-Solís, L. (2013). Protocol of extraction and processing of adult stem cells from abdominal adipose tissue: coordinates of the plastic surgeon in translational researching. *Cir. Plást. Iberolatinoam.*, 39(Supl. 1), s44-s50. <https://doi.org/10.4321/S0376-78922013000500012>
- Serra, M., Brito, C., Correia, C. y Alves, P. M. (2012). Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. *Trends in Biotechnology*, 30(6), 350-359. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.03.003>
- Slack, J. M. W. (2018). What is a stem cell? *Wiley interdisciplinary Reviews Developmental biology*, 7(5), e323. <https://doi.org/10.1002/wdev.323>
- Ude, C. C., Miskon, A., Idrus, R. B. H. y Abu Bakar, M. B. (2018). Application of stem cells in tissue engineering for defense medicine. *Military Medical Research*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40779-018-0154-9>
- Ullah, I., Subbarao, R. B. y Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells: current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2). <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- Wang, B. X., Kit-Anan, W. y Terracciano, CM. N. (2018). Many cells make life work. Multicellularity in stem cell-based cardiac disease modelling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3361. <https://doi.org/10.3390/ijms19113361>
- Zhu, Y. e Yi, Y. (2017). Research progress and clinical prospect of three-dimensional spheroid culture of mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 31(4), 497-503. <https://doi.org/10.7507/1002-1892.201612056>

Biofabricación de compuestos a partir de células madre y bioprocesos

RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA

Los métodos de cultivo de células madre hoy en día presentan desventajas por falta de monitoreo, por las limitaciones en la expansión debidas a la superficie limitada y a su incapacidad para soportar configuraciones complejas de crecimiento celular, lo cual los hace inadecuados para biofabricación y aplicaciones clínicas. Por estas razones, el uso de biorreactores en la producción de compuestos a partir de CM es esencial para satisfacer las necesidades de producción a gran escala; de esta manera se generan compuestos homogéneos ideales para aplicación en diferentes ámbitos (en especial, en el clínico-terapéutico). Además, los biorreactores ofrecen mayor seguridad, al permitir establecer estrategias efectivas de control de calidad de variables clave durante el proceso como, por ejemplo, el entorno fisicoquímico, los nutrientes, los metabolitos y los factores de crecimiento, que determinan la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular. De igual manera, permiten la supervisión y análisis constante de eventos como la apoptosis, la división celular y el movimiento celular.

El procesamiento de CM en biorreactores también facilita el transporte masivo, la alta densidad celular, el monitoreo, la retroalimentación y la especialización funcional específica del tejido, imitando así a los biorreactores finales, que son los tejidos y órganos dentro del cuerpo humano. Un ejemplo de la producción de compuestos para uso clínico-terapéutico a través de biorreactores —empleando como

recurso principal CM— es la producción de células β pancreáticas para trasplantar a pacientes que padecen diabetes.

Producción de células β pancreáticas

La capacidad de las CMM para modular y suprimir el sistema inmunológico podría representar una ventaja para la aplicación conjunta con células β y permitiría satisfacer las necesidades frente a limitaciones como la apoptosis que sufren las células β , la conexión interrumpida con MEC, las condiciones en el sitio de trasplante (hipoxia o falta de vascularización), la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y el crecimiento excesivo fibrótico debido a la respuesta inflamatoria del huésped.

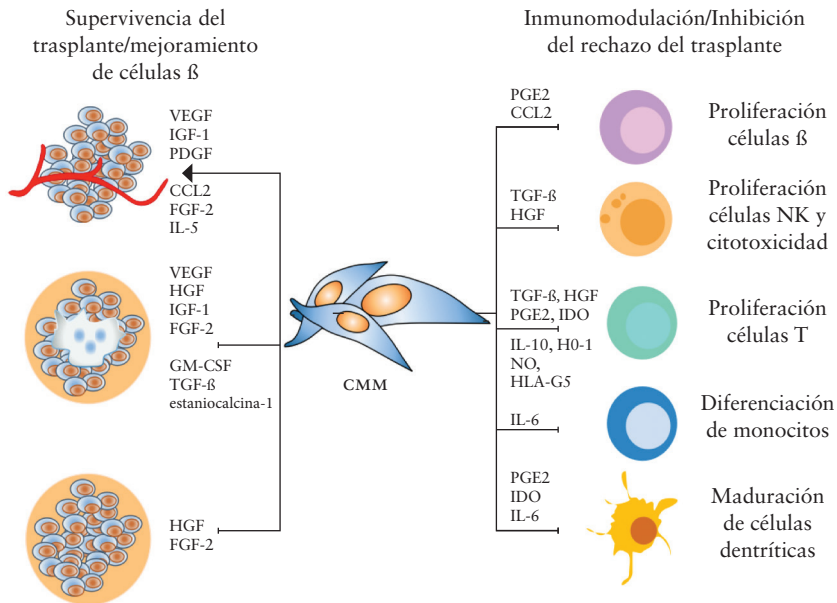
En el proceso del cocultivo, las CMM se encargan de inmunomodular a través de la expresión génica de citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la estaniocalcina-1 (STC-1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor inducible por hipoxia 1- α (HIF-1- α), los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), anexina A1 (ANXA1) y las moléculas de señalización; además, las CMM se encargan de la comunicación con células lesionadas. Este conjunto de acciones fortalece las células β y conducen a su viabilidad, supervivencia y mejor función en el sitio de trasplante (figura 22).

De las CMM también se destaca su disminución de la regulación de citocinas proinflamatorias (como KC/GRO, el interferón- γ (IFN- γ) y las interleucinas IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-8, IL-13 e IL-12p70), amortiguando así las respuestas inmunes tempranas. Las citocinas por lo general se pueden analizar a partir de cultivos, después de 48 horas de su inicio.

Antes del cultivo 3D de CM en biorreactores, es indispensable crear un microambiente celular 3D para CMM y células β .

Existen diversas formas de cultivo que se pueden aplicar de manera satisfactoria.

Figura 22. Efecto terapéutico de las CMM en el cocultivo con células β . Se muestra el efecto terapéutico de las CMM en el contexto del injerto de células β . Las CMM modulan los sistemas inmunitarios del huésped, por ejemplo, secretando diversos factores tróficos. Por lo tanto, previenen el rechazo de los injertos de células β alogénicas, mejoran la supervivencia del injerto promoviendo la neoangiogénesis en el sitio del trasplante, y previenen la apoptosis y la fibrosis.



Abreviaturas: VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; CCL2: proteína-1 quimioatrayente de monocitos 1; FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico básico; IL-5/6/10: interleucinas 5, 6 y 10; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos; TGF- β : factor de crecimiento transformante β -relacionado; PGE2: prostaglandina E2; IDO: indoleamina 2,3-dioxigenasa; HO-1: hemo-oxigenasa 1; NO: monóxido de nitrógeno; HLA-G5: antígeno leucocitario humano G5.

Tomada y modificada de Petry, 2018.

Cultivo con agregación celular y formación de esferoides

Las células β se originan a partir de los islotes de Langerhans en el páncreas. Gracias a las uniones y a las moléculas de adhesión —como

las cadherinas—, las células β presentan una tendencia a la aglomeración; por lo tanto, una de las configuraciones de cultivo más adecuada es la de esferoides, los cuales proporcionan rápida proliferación, alta viabilidad, destino celular estable y nutrientes suficientes a las células β , contribuyendo así a su función en la homeostasis de la glucosa. Se debe tener en cuenta el tamaño de los esferoides, ya que cuando el tamaño es superior a los 200 μm de diámetro, no hay un suministro suficiente de nutrientes y se alteran de forma negativa la vasculogénesis y la angiogénesis.

Por otro lado, las CMM presentan un comportamiento similar al de las células β , al generar grupos de 500 a 10.000 células y crear su propio microentorno. La apoptosis en los esferoides de CMM depende del tamaño del esferoide, del número de células y del tiempo de cultivo. Moléculas reguladoras de la apoptosis —como las caspasas, los Notch o la interleucina-1— se activan por la aglomeración e inducen la producción de factores moduladores de la inflamación (la TSG-6, o proteína del gen 6 estimulada por TNF, y la STC-1) y otras moléculas terapéuticas. La integrina y la cadherina juegan un papel fundamental en la construcción de puentes entre células y la MEC. Las cadherinas varían según el origen de la CMM: en las CMM aisladas de cordón umbilical, la E-cadherina se expresa con mayor frecuencia; mientras que en las CMM derivadas de médula ósea, la N-cadherina y la cadherina-11 se expresan con mayor prevalencia. Es importante resaltar que los esferoides de CMM no son homogéneos, ya que son influenciados por diversos factores, como lo es la conexión a la MEC, lo que refleja los niveles de cadherina/integrina y la tensión cortical, dando como resultado el desarrollo de células redondeadas con baja tensión intracelular dentro de los esferoides y la propagación de células con alta tensión intracelular en el exterior.

Al momento de realizar un cocultivo entre CMM y células β , se debe tener en cuenta que el comportamiento celular es bastante dinámico y las opciones de cultivo son varias; por ejemplo, las CMM y las células β se pueden cocultivar directa e indirectamente como células alimentadoras o en modo mixto. Se ha establecido que es necesario el contacto directo de célula a célula para que haya un mayor beneficio.

Cultivo en biorreactores con crecimiento celular en portadores

Una forma de cultivo de amplio uso en sistemas de biorreactores es el crecimiento celular en portadores de diferentes tamaños, es decir, microportadores de 100-300 µm y macroportadores de 0.6-5 mm. Los microportadores pueden variar según el tipo de superficie; existen porosos y no porosos; se destacan los porosos porque imitan con mayor exactitud un entorno 3D; todos los tipos de microportadores facilitan la adhesión y la proliferación celular, pero la mayor limitación es el impacto generado sobre las células en el momento de su recolección, lo cual afecta de modo directo el rendimiento celular. Por lo tanto, cuando se cultivan las células, el objetivo es encontrar un equilibrio entre la adhesión y el crecimiento eficiente, y los altos rendimientos (figura 23).

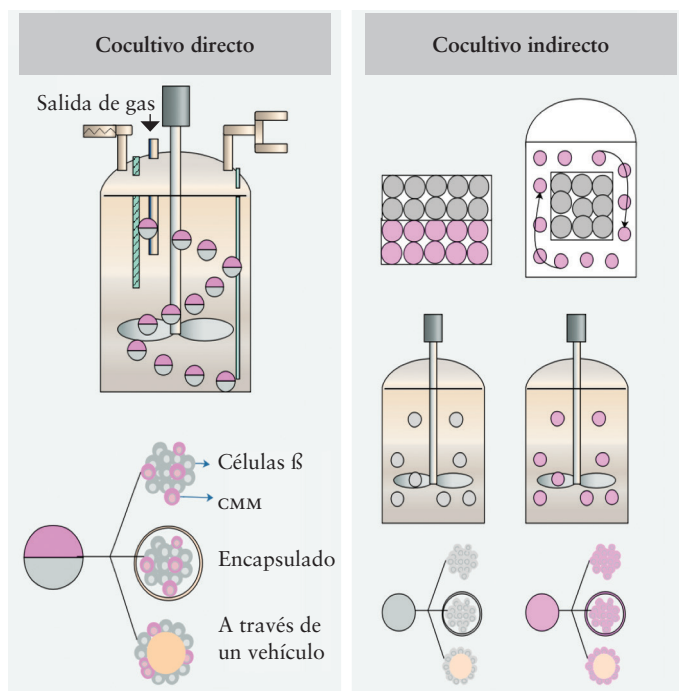
Lo microportadores permiten generar CMM que muestran una gran viabilidad y capacidad de diferenciación. Las células de islotes humanos individuales cultivadas en microportadores han mostrado una secreción estable de insulina, con alta viabilidad y actividad metabólica. Se ha comprobado que los microportadores no solo facilitan el crecimiento de CMM y célulasβ, sino que también mejoran su funcionalidad (tabla 9).

Tabla 9. Cuadro comparativo entre el cocultivo directo e indirecto en portadores

Cocultivo directo	Cocultivo indirecto
Los tipos de células se adicionan juntos al biorreactor y se distribuyen de forma homogénea en los microportadores.	Cada célula se cultiva en el microportador adecuado, según sus características. Se combinan los dos lotes de microportadores, lo que muestra desventajas, ya que las células no se pueden separar por completo. Únicamente las células migran a diferentes microportadores. La separación estricta solo puede llevarse a cabo por medio de configuraciones de tamices y membranas.
Para ambas formas de cultivo, la formación de aglomeraciones representa una gran limitación, debido a que se impide un suministro de nutrientes uniforme y una recolección enzimática más difícil de las células dentro de los aglomerados.	

Elaboración propia.

Figura 23. Conceptos de biorreactores para el cocultivo de CMM y células β . Las células β y las CMM se pueden cultivar utilizando un modo directo o un modo indirecto. Por lo tanto, las células pueden estar presentes como agregados o como células encapsuladas o unidas a un portador. En cocultivo directo, se debe elegir un medio y una velocidad de aireación para ambas células, mientras que el cocultivo indirecto permite que cada tipo de célula se suministre con un medio específico y una velocidad de aireación para cada célula.



Tomada y modificada de Petry, 2018.

Cultivo con encapsulación

Los microportadores porosos y no porosos no proporcionan una protección completa a las células frente a factores externos; por ello, la encapsulación puede proteger a las células no solo contra las fuerzas de corte hidrodinámicas, sino también contra el sistema inmunitario del huésped en el sitio de trasplante, manteniendo o aumentando la funcionalidad celular. El material de la encapsulación es un factor

relevante, por lo cual debe seleccionarse uno que imite la geometría, la química y el entorno de señalización de la MEC natural, lo mismo que la permeabilidad, de modo que permita el transporte de nutrientes adecuado teniendo en cuenta los requerimientos celulares.

En los trasplantes, la elección del material de encapsulación representa un factor determinante, ya que debe minimizar la probabilidad de rechazo por parte del receptor. El material que ha mostrado ser el más adecuado es el alginato, que tiene efectos positivos en las células β y en las CMM, aumentando la viabilidad celular y mejorando la funcionalidad. Se concluye que la encapsulación representa una estrategia útil de cocultivo en un sistema de biorreactor.

Uso de biorreactores para cultivo de CMM

En principio, para un adecuado bioproceso es recomendable expandir de manera individual (células β y CMM), en cultivos puros, con el fin de generar la cantidad necesaria de células para el cocultivo en biorreactor. Para ello, existen diversas tecnologías de biorreactores que se pueden emplear. A continuación, se exponen los biorreactores más usados y los parámetros para el cocultivo, según se trate de cultivo de CMM o células β .

Biorreactor para el cultivo 3D de CMM. El cultivo de CMM en un biorreactor tiene dos objetivos principales: expansión celular y funcionalidad celular mejorada. Muchas veces se presentan dificultades en la regulación de los microentornos en los biorreactores. Un sistema de biorreactor controlado ofrece la posibilidad de influir específicamente en el secretoma de las CMM y de mejorar el efecto terapéutico resultante al tener efectos positivos en la secreción de factores tróficos clásicos, como el BDNF, el factor de crecimiento nervioso (NGF), el VEGF o el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). Esto resalta el impacto de las condiciones de cultivo en la funcionalidad celular. Las principales condiciones requeridas para la proliferación de CMM en biorreactores incluyen una gran relación de área de superficie a volumen, un sistema cerrado, inoculación y recolección automatizada, además del control en línea automatizado de los parámetros de cultivo (tabla 10).

Tabla 10. Tipos de biorreactor para el cultivo 3D de CMM:
ventajas y desventajas

Tecnología del biorreactor	Aspectos generales
Reactores de tanque agitado (RTA) para el cultivo de células madre mesenquimales (CMM)	Se pueden cultivar las células en esferoides y microportadores. El volumen celular máximo obtenido en RTA hasta el momento ha sido de 35 L, con una expansión de 50 veces y 2.6×10^{10} células en total. La baja cantidad de inóculo inicial mejora la proliferación, en especial en cultivos donde se emplean los microportadores; mientras que en cultivos basados en la formación agregados, una baja densidad de inoculación no permite que se forme un número suficiente de contactos intercelulares. Se recomienda una densidad de inoculación de 4.5×10^5 células por mL. La agitación es un parámetro importante del proceso, porque la mezcla homogénea es necesaria para prevenir el agrupamiento de microportadores/agregados cargados con células. El proceso de expansión de las CMM se produce en un sistema trifásico: medio, microportador cargado con células/agregados celulares y burbujas de gas oxígeno. La aireación es un aspecto importante durante la agitación, aunque las células de mamíferos presentan una baja demanda de oxígeno. La alta aireación induce fuerzas cortantes que tienen mayor impacto en los cultivos de aglomerados, y reducen la viabilidad celular. El esfuerzo cortante no es constante; se aumenta en cantidades mayores al tener que aumentar la agitación, lo que afecta la viabilidad celular.
Reactores de lecho fijo (RLF) para el cultivo de CMM	Las células crecen en macroportadores de 500 μm de diámetro, formando un lecho estable en el reactor. Hay que tener especial atención con la formación de canales y gradientes. Se caracteriza por un bajo esfuerzo cortante, sin picos de corte cerca del impulsor, como se ve en un RTA. El corte es constante en todas las escalas porque la velocidad superficial permanece constante en un valor que no afecta el crecimiento de las CMM. La recolección se constituye en una desventaja para los RLF, debido a que la viabilidad celular se ha observado disminuida en diversas investigaciones. No es clara la razón por la cual se muestra esta disminución, pero se sugiere una inducción de estrés celular.

Continúa

Tecnología del biorreactor	Aspectos generales
	Los RLF también tienen una alta aplicabilidad para la diferenciación de CMM; muchas veces muestran una adecuada viabilidad y funcionalidad. Para el proceso de diferenciación, el biorreactor se puede adecuar con el fin de proporcionar estímulos de diferenciación adicional a las células, ya que responden a la rigidez y estructura de la superficie.

Elaboración propia.

Biorreactor para el cultivo 3D de células β pancreáticas

Son pocos los estudios que han reportado la producción de células β en biorreactores; lo más común es el uso de microrreactores con fines de investigación. Se ha reportado que en conformaciones de cultivos 2D las células β pierden su funcionalidad; por consiguiente, la mejor opción son los cultivos 3D, ya que generan un microambiente que conserva la funcionalidad y viabilidad de las células β , y mejoran la regulación de la expresión del gen de la insulina. Sin embargo, en ambas modalidades de cultivo, las células β tienen una baja tasa de crecimiento y presentan un mayor consumo de oxígeno, ya que por lo general presentan hipoxia debido a la secreción de insulina. Por lo tanto, el microentorno celular y el suministro de nutrientes para las células β deben estar estrechamente controlados; incluso más que los de las CMM. En la tabla 11, se presentan los aspectos generales de diferentes tecnologías de reactores utilizados para el cultivo de células β .

Se ha descrito la posibilidad de obtener células β a partir de la expansión y la subsiguiente diferenciación pancreática de las CMPi. Sin embargo, esto no ofrece rentabilidad frente al mantenimiento de la funcionalidad *in vitro* de las células β , pues se infiere que la funcionalidad depende de un microambiente adecuado similar al contexto *in vivo*, en donde los islotes se encuentran rodeados por una MEC y una variedad celular (CMM, endoteliales, neuronales y exocrinas). Las condiciones de cultivo actuales deben modificarse para mantener las células β funcionales, y se pueden crear microentornos 3D óptimos dentro de los biorreactores cultivando células β con otros tipos de células, por

ejemplo, con CMM. Cuando ya se han obtenido las células en condiciones óptimas, con los debidos controles de calidad, es posible realizar el cocultivo en biorreactor de CMM y células β . Enseguida de la tabla 11 se describe la mecánica del cocultivo en biorreactor.

Tabla 11. Tipos de biorreactor para el cultivo 3D de células β ; principales ventajas y desventajas

Tecnología del biorreactor	Aspectos generales
Reactor de recipientes de pared giratoria para el cultivo de células β	Se ha usado para el cultivo de islotes humanos. Debido a que tiene pared giratoria, se mantiene una rotación continua que genera una microgravedad que sostiene los islotes; además, presenta un bajo esfuerzo cortante, y una transferencia eficiente de nutrientes y oxígeno en el medio. Como desventaja se encuentra la aglomeración de islotes, la cual se ha logrado suplir por medio de andamios. En cultivo en un biorreactor, los islotes desarrollan múltiples canales nutricionales, mejoran la expresión del gen de la insulina y la respuesta a la estimulación a la glucosa, lo cual permite inferir que las células β podrían expandirse. Sin embargo, hasta el momento no hay reportes de experimentos a gran escala que satisfagan cantidades necesarias para terapia celular.
Reactores de tanque agitado para el cultivo de células β	Las células β se cultivan por lo general en agregados o cápsulas y no en microportadores. En investigaciones donde se han cultivado células β individuales en microportadores, se ha observado un crecimiento lento, compensado con una adecuada función celular. Sin embargo, muestran una mayor eficiencia en comparación con cultivos 2D.
Reactores de lecho fijo para el cultivo de células β	En algunos casos, las células β se han cultivado en alginato, en donde las células individuales formaron agregados, y mostraron eficiencia en cuanto a viabilidad y secreción de insulina. No se ha reportado resultado acerca de la recolección, pero se sugiere que se presentarían los mismos inconvenientes que en la recolección de CMM.
Otros tipos de reactores utilizados para las células β	Una alternativa representativa es el reactor de lecho fluidizado; allí, las células β encapsuladas en alginato muestran una viabilidad más alta que en un cultivo 2D. Se puede inferir que otros tipos de biorreactores, como los sistemas de reactor de onda, podrían ser adecuados, pero aún no se ha reportado su uso para células β.

Elaboración propia.

Cocultivo en biorreactor con CMM y células β

El cocultivo a más grande escalas es necesario para producir un número adecuado de células β funcionales para la terapia celular o para la detección de fármacos. El diseño de cocultivos comprende varios aspectos que son fundamentales para obtener un producto celular de adecuada calidad. Entre estos, se sugiere el uso de portadores (microportadores y macroportadores), debido a la facilidad de recolección, que conserva las proteínas de la superficie de las células para mejorar su funcionalidad. En cuanto al medio de cultivo, debe satisfacer las necesidades de ambos tipos celulares, pues las CMM *in vitro* son más robustas que las células β , por lo cual estas deben ser favorecidas en el diseño del cocultivo. Respecto al biorreactor, los reactores RTA (reactor de tanque agitado), RLF (reactores de lecho fijo) y los de lecho fluidizado son apropiados para el cocultivo directo. Las células β y las CMM pueden cultivarse como agregados mixtos, cápsulas o en vehículos. El cocultivo indirecto ofrece más opciones, como el uso de agregados de células β encapsuladas como portadores de las CMM. En el enfoque de cocultivo indirecto, también es posible crear un microentorno óptimo específico para cada tipo de célula; por ejemplo, se pueden compartimentar con membranas. Otros parámetros para tener en cuenta son: la regulación de la producción en cocultivo y las características de las CMM y las células β .

Regulación de la producción en cocultivo

Los cocultivos en células de mamíferos no han sido muy documentados; sin embargo, se debe tener en cuenta que, para cantidades grandes de producción, se necesita un microambiente bien controlado y equilibrado con el fin de evitar problemas, como la heterogeneidad que puede provocar inestabilidad en el biorreactor y una pérdida de viabilidad celular. Es importante definir criterios preliminares de configuración del bioproceso (se pueden emplear placas *transwell* o microrreactores), como el modo de cocultivo (directo, indirecto o mixto) y las relaciones de cocultivo de las células (tasas de crecimiento, tamaños de población); esto es importante debido a que puede haber una población

celular que supera a la otra; en el caso de las CMM y las células β , las CMM superan a las células β porque su tasa de crecimiento es hasta tres veces más rápida —en el peor de los casos: μ (CMM) = 0.5 d^{-1} , μ (células β) = 0.17 d^{-1} —. Para lograr que las células β sean la población dominante, se deben optimizar las proporciones celulares y las condiciones del cocultivo; es importante tener en cuenta que las tasas de crecimiento presentan variaciones en los cocultivos, debido a que las células pueden influir en la proliferación de cada una. La relación también puede influir en los efectos terapéuticos y la funcionalidad celular *in vivo*.

Parámetros importantes para CMM y células β

Las CMM y las células β son biológicamente diferentes, pero desde el punto de vista del bioprocesamiento poseen características similares. En cuanto a su biología, las células β son células unipotentes, diferenciadas y derivadas del endodermo, mientras que las CMM son multipotentes, con alta capacidad de diferenciación y derivadas del mesodermo. Desde el ámbito del bioprocesamiento, los dos tipos de células crecen como células adherentes dentro del mismo rango de temperatura ($30\text{-}37^\circ\text{C}$) y rango de pH ($7.0\text{-}7.4$), y consumen los mismos nutrientes (metabolito clave = glucosa) y oxígeno a tasas similares.

La funcionalidad de los islotes pancreáticos es atribuida a las características de las células β , debido a que se constituyen en su principal componente celular (de 1560 células que componen un islote, 1140 son células β). Teniendo en cuenta la tasa de crecimiento de las células β , es importante establecer un microambiente óptimo de cocultivo que ralentice el crecimiento de las CMM a un nivel deseado, sin afectar la secreción de los factores tróficos necesarios para el mantenimiento de las células β . El comportamiento de ambos tipos de células en el cocultivo es difícil de predecir porque se influyen mutuamente, de maneras desconocidas; se ha observado que la morfología y el linaje celular son factores que afectan de forma contundente al autoensamblaje, la diferenciación y la actividad celular (de las CMM); por ello son factores que se deben considerar y equilibrar en una configuración de cocultivo (tabla 12).

Tabla 12. Parámetros relevantes para el cultivo de CMM e islotes o células β

		CMM	CMM-TERT	Islote	1.1B4	MIN6*
Parámetro biológico	μ [d^{-1}]	0.33-1.1	0.4-0.7 [#]	0.11	0.84	0.19-0.23
	t D [h]	15-50	24-42	151	20	72-88
	q GLC [$pmol\ cel^{-1}\ h^{-1}$]	0.13-0.7	0.02-0.5 [#]	nd	0.08 [#]	nd
	q OX [$fmol\ cel^{-1}\ h^{-1}$]	90-100	300	23-139	nd	
	Densidad de siembra [$células\ cm^{-2}$]	1000-10.000 [#]		Depende del método de reagregación	5000-10.000 [#]	>80.000
	Densidad celular final [$células\ cm^{-2}$]	5 10^4 (dinámico) 2 10^5 (estático) [#]			1 10^5 (estático) [#]	2-3 10^5 (estático) [#]
	Máx. volumen de trabajo [L]	35	2.4 [#]	<0.1		
	pH [-]	7.0-7.4				
	T [°C]	30-37				
	k _L a [h^{-1}] ⁺	0.6	4.4	0.2	nd	
Parámetro de proceso	Sensibilidad al corte τ [$N\ cm^{-2}$]	1.2 10^{-5}		Cultivo, principalmente estático, con bajo cizallamiento.		
	Material de superficie de crecimiento	Poliestireno tratado con TC, microprocesador y microprocesador con diferentes recubrimientos		Principalmente, recipientes de cultivo tratados con TC (poliestireno)		
	Formación agregada	Posible, pero menor tendencia		Fuerte tendencia		
	Medios de cultivo	SCM, SFM, CDM		SCM con 10-20 % de suero		
	Concentración de glucosa [mM]	Por lo general 5.5, 5-25		5.8 recomendado, 5-25		

μ : tasa de crecimiento; ^D: duplicar el tiempo; ^qGLC: consumo de glucosa; ^qOX: consumo de oxígeno; k_L a: coeficiente de transferencia de oxígeno; TC: cultivo de tejidos; SCM: medio que contiene suero; SFM: medio sin suero; CDM: medio químicamente definido; nd: no determinado.
* origen murino; [#] datos propios; ⁺ aireación con aire.

Tomada y modificada de Petry, 2018.

Ruta metabólica y mecanismos de regulación

Para una correcta expansión de las CM en cultivos de biorreactor, es fundamental conocer los mecanismos reguladores clave y las vías asociadas con la autorrenovación de CM, y mantener un fenotipo pluripotente durante la biofabricación. Se ha observado que, durante la proliferación, las CM tienen demandas energéticas únicas comparadas con las células diferenciadas, las cuales presentan un alto flujo glucolítico; esto puede ser controlado por medio de FT y de moléculas de la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-cinasa/Akt, incluido el blanco del sistema de rapamicina.

El estudio del perfil transcripcional y de metabolitos ha permitido tener un conocimiento más amplio del fenotipo de las CM, con el fin de caracterizar los productos después de un bioprocesamiento y de facilitar la optimización para diferentes condiciones de cultivo. Sin embargo, las herramientas transcriptómicas y metabolómicas son poco empleadas para la caracterización de cultivos en la actualidad.

Durante el tiempo de cultivo se debe realizar un análisis del transcriptoma teniendo en cuenta la expresión de genes; además, es preciso seleccionar las vías más relevantes, que son la glucólisis, el metabolismo de los aminoácidos, los reordenamientos del citoesqueleto y la resistencia al estrés.

En cuanto a la glucólisis, se determinan las enzimas glucolíticas; las más destacadas son: la aldolasa A (ALDOA), la enolasa 2 (ENO2), la glucosa fosfato isomerasa (GPI) y la fosfoglicerato cinasa 1 (PGK1); además de los transportadores de glucosa, como el SLC2A1 también conocido como GLUT1. También deben tenerse en cuenta la lactato deshidrogenasa A (LDHA) y los niveles de oxígeno, ya que en ambientes hipóxicos o cuando las CM experimentan estrés hipóxico, el factor 1 inducible por hipoxia (HIF1) se expresa y se mantiene.

Respecto al metabolismo de aminoácidos, las subunidades transportadoras SLC3A2 y SLC7A5 suelen presentar altas tasas de expresión; de igual manera ocurre con las enzimas catabólicas de aminoácidos, como la asparagina sintetasa (ASNS), la aminotransferasa 1 de cadena ramificada (BCAT1) y transaminasa glutámico-pirúvica 2 (GPT2, también conocida como alanina aminotransferasa). Los marcadores nucleares

(Oct-4) y los marcadores de superficie (TRA-1-60) se deben detectar en el último día de cultivo. También se muestra la expresión de marcadores de potencia TRA-1-60 y SSEA-4, y de un porcentaje muy bajo de células SSEA-1 (marcador de diferenciación temprana) positivas.

En cuanto a los reordenamientos del citoesqueleto/MEC, estos se caracterizan por la expresión de genes como vimentina (VIM), actina $\alpha 1$ (ACTA1) y transgelina (TAGLN), que regulan todos los tipos de filamentos de citoesqueleto de la siguiente manera:

- Microfilamentos (actinas, transgelinas).
- Filamentos intermedios (vimentina, queratinas y láminas).
- Microtúbulos (tubulinas).

Por último, la resistencia al estrés se encuentra regulada por un conjunto de genes que muestran un comportamiento común: las metalotioneínas (MT), que se caracterizan por ser marcadores de estrés. En conjunto, el análisis del perfil transcripcional demuestra la importancia de cultivar en condiciones por completo definidas para homogeneizar y estandarizar el fenotipo celular final.

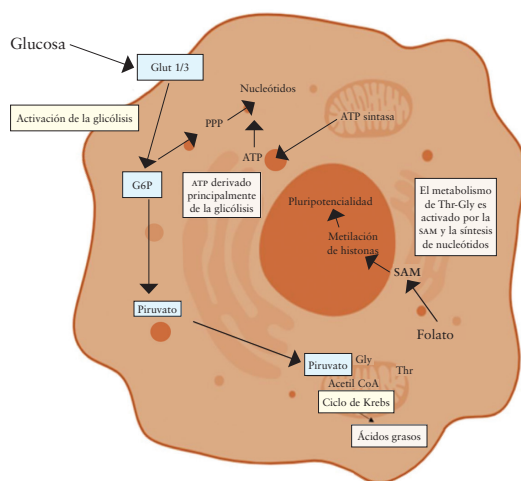
El análisis del metabolismo, específicamente el del carbono central, permite determinar los cambios metabólicos del microambiente durante un cultivo en biorreactor; ante todo, se deben tener en cuenta las tasas de consumo y producción de glucosa, lactato y aminoácidos; además de las principales reacciones del metabolismo central del carbono al integrar los datos de cambio transcripcional (figura 24).

En los cultivos de CM en biorreactores, por lo general se observa mayor proporción de producción de lactato con respecto al consumo de glucosa en comparación con los cultivos tradicionales, lo que es consecuente con un incremento en la regulación de la maquinaria glucolítica y de LDHA. También se sugiere que la producción de lactato se da a través del piruvato derivado del catabolismo de aminoácidos y que en los biorreactores existe producción de energía en comparación con los cultivos en 2D (donde la síntesis de biomasa se da con una menor formación de subproductos); esto debido a que el consumo de glucosa y aminoácidos es mayor en las configuraciones de cultivo en 2D; sin embargo, son menores las proporciones de lactato/glucosa

y la producción de amoníaco al consumo de aminoácidos AMN/NET (AMN: producción de amonio; NET: consumo de aminoácidos).

Figura 24. Metabolismo del carbono central de las CM.

Representación esquemática de las principales reacciones del metabolismo central del carbono, destacando los cambios en el transcriptoma de las células CM en el sistema de cultivo 2D y el sistema de cultivo biorreactor.



Abreviaturas: CoA: coenzima A; SAM: S-adenosilmetionina.

Tomada y modificada de Silva, 2015 y de Shyh-Chang, 2013.

En cuanto al metabolismo de aminoácidos, este se puede dividir en tres grupos: el primero corresponde a los aminoácidos consumidos, los cuales se absorben de forma reducida debido a que los genes metabólicos de los aminoácidos se observan enriquecidos y regulados al alza en el perfil transcripcional; esto permite inferir que los aminoácidos se consumen menos, pero se incrementa su canalización hacia las rutas catabólicas, por ejemplo, su uso como alimentación de intermedios del ciclo de Krebs.

El segundo grupo comprende los aminoácidos que se acumulan en el medio de cultivo; por ejemplo, la glicina, el glutamato y la alanina, que se producen en mayor cantidad durante el cultivo en biorreactores. El aumento de la producción de glicina se relaciona con la regulación positiva de la serina hidroximetiltransferasa 2 (SHMT2 mitocondrial),

que también contribuye al reciclaje del folato indispensable en el catabolismo de aminoácidos. El incremento en la producción de glutamato confirma las rutas catabólicas de los aminoácidos, ya que el glutamato es un intermediario común en la degradación de muchos aminoácidos antes de convertirse finalmente en α -cetoglutarato que libera amoníaco. Además, el glutamato puede ser transaminado por la transaminasa glutámico-pirúvica 2 (GPT2), regulada al alza por duplicado en el cultivo en biorreactores, lo que contribuye al aumento de la acumulación de alanina.

Y el tercer grupo incluye aminoácidos para los cuales se observa que el perfil de absorción y producción está invertido entre los cultivos en biorreactor y 2D. La histidina y la treonina se caracterizan por ser aminoácidos esenciales en las células humanas; es imposible reflejar su producción. Por consiguiente, las tasas reflejan la degradación de la proteína o pueden interpretarse como un consumo reducido de estos aminoácidos si son proporcionados por proteínas o péptidos cuando el medio utilizado no se encuentra libre de proteínas. Por otro lado, en el caso de la prolina y la asparagina, por lo general el aumento de la producción se ve respaldado por la regulación positiva de la pirroline-5-carboxilato reductasa (PYCR) y la asparagina sintasa (ASNS), sus enzimas sintetizadoras, respectivamente.

Respecto a la integración de diferentes factores ambientales, es posible inducir vías metabólicas; por ejemplo, en un ambiente controlado con bajo nivel de oxígeno se observa una vía similar a la glucólisis anaerobia de Warburg, pero sin evidencia de respuesta al estrés hipóxico. La glucólisis anaerobia se constituye en un aspecto distintivo y relevante del fenotipo de las CM; además, los niveles más bajos de oxígeno se han descrito como un parámetro clave en el mantenimiento de la pluripotencia. Es importante resaltar que, en condiciones hipóxicas, la glucólisis anaerobia se ve favorecida sobre la fosforilación oxidativa como fuente de generación de energía; esto se ajusta al incremento de la regulación de la maquinaria glucolítica y LDHA, con la disminución de la regulación de las reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) que preceden a la fosforilación oxidativa; de esta manera se demuestra la relación entre la alta producción de lactato con respecto al consumo de glucosa. Teniendo en cuenta la anterior

descripción, se sugiere que el catabolismo de los aminoácidos puede funcionar como una fuente de alimentación de las reacciones restantes del CAT, respaldadas por las proporciones tan altas de producción de amoníaco con respecto al consumo de aminoácidos.

Por otro lado, en el cultivo en biorreactores se observa un incremento en la regulación de los transportadores de membrana de la glucosa y de la mayoría de los aminoácidos; sin embargo, las tasas de consumo son más bajas, lo cual indica que no es obligatorio realizar correlaciones directas, por ejemplo, para los transportadores de glucosa; se ha visto que el aumento de la expresión génica no conduce necesariamente a mayores tasas de captación de glucosa, lo que se correlaciona mejor con la actividad de fosforilación mitocondrial.

Modelo matemático general en un bioproceso

Con el fin de lograr bioprocesos rentables, escalables y robustos para la obtención de cantidades considerables de CM, se deben establecer modelos matemáticos que tengan en cuenta aspectos como: concentración de O_2 , función de vacío, tortuosidad, esfericidad, relación del área de superficie a volumen, tensión de corte, perfusión del medio y caída de la presión, dependiendo del tipo de biorreactor y del compuesto que se desea producir.

Un ejemplo es el modelo matemático para calcular la concentración de O_2 en un biorreactor de lecho empacado fabricado en polidimetilsiloxano permeable a los gases (PDMS), diseñado para desacoplar el transporte de oxígeno del suministro de nutrientes, con el fin de producir CMM.

En el estudio realizado por Osiecki y colaboradores en 2015, el modelo de transporte de masa del biorreactor se utilizó para estimar la concentración de O_2 en estado estacionario a lo largo del radio a una concentración celular cinco veces la confluencia máxima de las CMM (100.000 células/cm²).

Asumiendo que el oxígeno solo se difunde de modo radial, la ecuación 1 describe la concentración de oxígeno en el recipiente del biorreactor, mientras que la ecuación 2 describe la concentración de oxígeno en la pared del biorreactor.

Ecuación 1. Concentración de oxígeno en el recipiente del biorreactor

$$c_r = c_{R_1} - \frac{K}{4D_R} (R^2 - r^2) - \frac{KR_1^2}{2D_{pdms}} \ln \left(\frac{R_2}{R_1} \right) \quad 0 \leq r \leq R_1$$

Donde:

- C_r : es la concentración en cualquier punto del radio (r).
 C_{R_1} : es la concentración en el radio del biorreactor interno. La solubilidad del oxígeno en el medio (0.2 mM), radio 1 (R_1), unidades de medida mM.
 K : es la captación volumétrica específica de oxígeno (mM/cm³/s), derivada de las dimensiones del biorreactor y la tasa de absorción de oxígeno por parte de las CM (2.5x10⁻¹⁷ mM/s/célula).
 D_R : es el coeficiente de difusión corregido del oxígeno dentro del recipiente del biorreactor.
 D_{pdms} : es el coeficiente de difusión de PDMS (5.0x10⁻⁵ cm²/s).
 R_2 : radio 2.

Ecuación 2. Concentración de oxígeno en la pared del biorreactor C_r

$$c_r = c_{R_2} - \frac{KR_1^2}{2D_{pdms}} \ln \left(\frac{R_2}{r} \right) \quad R_1 \leq r \leq R_2$$

Donde:

- C_{R_2} : es la concentración en el biorreactor externo; R_2 radio, que es la solubilidad del oxígeno en polidimetilsiloxano permeable a los gases (1.3 mM).

Se comparan dos biorreactores: uno pequeño, de 160 cm²; y uno de mayor tamaño, de 2800 cm². El balance de masa no predijo un gradiente de 0.2 significativo en el biorreactor a pequeña escala de 160 cm². Sin embargo, en el biorreactor más grande (de 2800 cm²), se predijo una caída en la concentración de 0.2 mM a 0.146 mM en el centro. Como la pared de PDMS ofrece una resistencia insignificante a la difusión de O₂ en ambas configuraciones del biorreactor, el único factor que limitó la concentración de O₂ en el biorreactor fue la solubilidad del O₂ en el medio.

Sin embargo, a medida que el espacio del recipiente del biorreactor se llenó con partículas no permeables a los gases, se aplicó un factor de corrección al coeficiente de difusión (ecuación 3) basado en el vacío (ϵ), la esfericidad (φ) y la tortuosidad (τ).

Ecuación 3. Factor de corrección al coeficiente de difusión D_R

$$D_R = \frac{\epsilon}{\tau} D_m$$

Donde:

ϵ : vacío, diferencia entre el volumen vacío del biorreactor y el volumen de líquido inyectado en el biorreactor.

φ : esfericidad.

El factor de corrección para el coeficiente de difusión de oxígeno en el medio D_m ($3.290 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) es una función del vacío (ϵ) y la tortuosidad (τ). El vacío, calculado como la diferencia entre el volumen vacío del biorreactor y el volumen de líquido inyectado en el biorreactor, se encontró que era 0.4.

Ecuación 4. Tortuosidad (τ)

$$\tau = \frac{1.23 (1 - \epsilon)^{\frac{1}{3}}}{\epsilon \times \varphi^2}$$

La tortuosidad es una función del vacío y la φ .

Ecuación 5. Esfericidad (φ)

$$\varphi = \frac{(36 \times \pi \times n (1 - \epsilon)^2)^{\frac{1}{3}}}{a}$$

Donde:

n : número de partículas.

a : relación entre el área de superficie y el volumen.

La esfericidad se calcula en función de n , ϵ y a . Para calcular la tensión de corte a partir de la perfusión del medio, la caída de presión (P) se calculó primero mediante la ecuación de Ergun (ecuación 6):

Ecuación 6. Tensión de corte a partir de la perfusión del medio

$$\Delta p = \frac{150\mu(1 - \varepsilon)^2 V_s L}{\varepsilon^3 D_p^2} + \frac{1.75(1 - \varepsilon)p V_s^2 L}{\varepsilon^3 D_p}$$

Donde:

μ : viscosidad del medio es de 0.008 poise.

p : densidad del medio es 0.99 g/cm³.

V_s : velocidad superficial.

D_p : diámetro de las partículas.

L : longitud/altura del lecho empacado.

Para calcular la fuerza de corte (τ), la caída de presión se multiplicó por el área de la sección transversal del flujo de fluido ($\frac{\pi D^2 \varepsilon}{4}$) y se dividió por el área de superficie del fluido en contacto con el andamio (área de crecimiento del andamio, es decir, 160 cm² y 2800 cm²).

La ecuación de Ergun en este estudio se usó para calcular el esfuerzo cortante debido al flujo de fluido en el biorreactor. El esfuerzo cortante hidrodinámico del medio de perfusión en el biorreactor pequeño (5 ml/día) y en el biorreactor grande (0.5 ml/min) se calculó en 9.5x10⁻⁵ Pa y 1.25x10⁻³ Pa, respectivamente.

El aumento en la concentración celular se evalúa según la relación

$$\frac{X_{max}}{X_0}$$

X_{max} : pico de concentración celular (células por mililitro).

X_0 : representa las células inicialmente unidas en el día 0 (células por mililitro).

Por otro lado, el cálculo de la tasa específica de crecimiento celular o μ se determina utilizando un modelo cinético de primer orden simple:

$$\mu X = \frac{dX}{X dt}$$

Por último, también se puede evaluar la actividad metabólica, por lo general, con indicadores metabólicos. La fluorescencia es la función determinante que se tiene en cuenta; la fluorescencia *máxima* indica la fluorescencia en el día 4 de cultivo y la fluorescencia *i* representa la fluorescencia en el día 1 de cultivo.

Ecuación 7. Actividad metabólica

$$\frac{\text{Fluorescencia máxima}}{\text{Fluorescencia } i}$$

El uso de biorreactores para el cultivo de CM tiene un alto impacto cuando se desean obtener grandes volúmenes de células, ya sean para trasplante o modificadas para usos en investigación.

Bibliografía consultada

- Jenkins, M. J. y Farid, S. S. (2015). Human pluripotent stem cell-derived products: advances towards robust, scalable and cost-effective manufacturing strategies. *Biotechnology Journal*, 10(1), 83-95. <https://doi.org/10.1002/biot.201400348>
- Gamble, A., Pawlick, R., Pepper, A. R., Bruni, A., Adesida, A., Senior, P. A., Korbitt, G. S. y Shapiro, A. M. J. (2018). Improved islet recovery and efficacy through co-culture and co-transplantation of islets with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Plos One*, 13(11), e0206449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206449>
- Guo, G. R., Chen, L., Rao, M., Chen, K., Song, J. P. y Hu, S. S. (2018). A modified method for isolation of human cardiomyocytes to model cardiac diseases. *Journal of Translational Medicine*, 16, 288. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1649-6>
- Hassan, S., Simaria, A. S., Varadaraju, H., Gupta, S., Warren, K. y Farid, S. S. (2015). Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: downstream processing decisions. *Regenerative Medicine*, 10(5), 591-609. <https://doi.org/10.2217/rme.15.29>
- Jossen, V., van den Bos, C., Eibl, R. y Eibl, D. (2018). Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(9), 3981-3994. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8912-x>
- Kim, S., Lee, S. K., Kim, H. y Kim, T. M. (2018). Exosomes secreted from induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells accelerate skin cell proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103119>
- Klar, A. S., Zimoch, J. y Biedermann, T. (2017). Skin tissue engineering: application of adipose-derived stem cells. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2017/9747010>

- Lee, J., Cho, Y. S., Jung, H. y Choi, I. (2018). Pharmacological regulation of oxidative stress in stem cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2018/4081890>
- Lin, H., Du, Q., Li, Q., Wang, O., Wang, Z., Sahu, N., Elowsky, C., Liu, K., Zhang, C., Chung, S., Duan, B. y Lei, Y. (2018). A scalable and efficient bioprocess for manufacturing human pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Stem Cell Reports*, 11(2), 454-469. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.001>
- Placzek, M. R., Chung, I. M., Macedo, H. M., Ismail, S., Mortera Blanco, T., Lim, M., Jae, M. C., Iliana, F., Yunyi, K., Yeo, D. C. L., Ma Chi, Y. C., Polak, J. M., Panoskaltsis, N. y Mantalaris, A. (2009). Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *Journal of the Royal Society Interface*, 6(32), 209-232. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0442>
- Shyh-Chang, N., Daley, G. Q. y Cantley, L. C. (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development*, 140(12), 2535-2547. <https://doi.org/10.1242/dev.091777>
- Silva, M. M., Rodrigues, A. F., Correia, C., Sousa, M. F., Brito, C., Coroadinha, A. S., Serra, M. y Alves, P. M. (2015). Robust expansion of human pluripotent stem cells: integration of bioprocess design with transcriptomic and metabolomic characterization. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(7), 731-742. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0270>
- Sui, L., Danzl, N., Campbell, S. R., Viola, R., Williams, D., Xing, Y., Wang, Y., Phillips, N., Poffenberger, G., Johannesson, B., Oberholzer, J., Powers, A. C., Leibel, R. L., Chen, X., Sykes, M. y Egli, D. (2018). β -Cell replacement in mice using human type 1 diabetes nuclear transfer embryonic stem cells. *Diabetes*, 67(1), 26-35. <https://doi.org/10.2337/db17-0120>

Sobre las autoras

Ruth Mélida Sánchez Mora

Líder grupo Biotecnología y Genética Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (UCMC). Docente UCMC. Bacterióloga y laboratorista clínica. Magíster en Genética Humana. Doctora en Biotecnología.

Correo electrónico: ruthm.sanchezm@unicolmayor.edu.co

Gabriela Arévalo Pinzón

Bacterióloga y laboratorista clínica. Magíster en Ciencias Biológicas. Doctora en Ciencias Biomédicas. Profesora de la Facultad de Ciencias del Departamento de Biología en la Universidad Antonio Nariño. Forma parte del grupo de investigación de Biología celular funcional e ingeniería de biomoléculas.

Correo electrónico: garevalo78@uan.edu.co

Olga Lucía Ostos Ortiz

Bacterióloga y laboratorista clínica. Magíster Scientiae especialista en Genética Humana. Magíster en Administración Pública. Doctora (c) en Modelado y Simulación de Política Pública.

Correo electrónico: olga.ostos.ortiz@gmail.com

Índice temático

A

adhesión celular 26, 27, 30, 31, 47, 48, 51, 54, 56, 61, 95.
aditivos 25, 33, 35, 38-42.
agregados celulares 48, 50, 51, 58, 59, 94-96, 101, 102, 104, 106.
aislamiento de células madre 31-35, 77.
andamiaje 48, 51-53, 61, 63, 77, 78, 79, 93.
autorrenovación 15, 17, 18, 22, 26, 31, 32, 38, 69, 93.

B

biobancos 34, 44, 70.
biocompatibilidad 34, 49, 51, 74, 83.
biofabricación 47, 49, 62, 63, 65, 66, 99, 112.
biomaterial 47, 48, 49, 73, 74, 77, 78.
biorreactores 47, 56, 57, 59, 60-64, 91-93, 95, 96, 99, 100, 103-109,
112-120.
biosensores 89, 90.
blancos terapéuticos 25, 54, 89.

C

cáncer 28, 53, 82, 83, 89, 90.
caracterización 25, 31, 32, 36, 38, 42, 44, 112.
cardiopatía 44, 70, 71-74, 85, 86.
célula madre hematopoyética 15, 16, 19, 54, 80, 81, 82, 83.
células de señalización. *Véase* células madre multipotentes.
células hematopoyéticas 70.
células madre adultas 17, 21, 22, 31, 36, 79.
células madre embrionarias 16, 17, 21, 22, 31, 69.
células madre mesenquimales 16, 19, 20, 21, 31-39, 41-44, 57, 60, 70-76,
78, 79, 80, 82, 84, 85, 87, 100-111, 116.

células madre multipotentes 17, 19, 110.
células madre pluripotenciales inducidas 18, 22, 23, 31, 74, 86, 87, 88, 89, 91, 93, 94, 95, 96.
células madre progenitoras 16, 20, 21, 71.
células madre unipotentes. *Véase* células madre progenitoras.
células β pancreáticas 81, 82, 100-105, 107-111.
citocinas 16, 20, 70, 72-76, 80, 81, 85, 100.
citometría de flujo 32, 36, 45.
CMA. *Véase* células madre adultas.
CME. *Véase* células madre embrionarias.
CMH. *Véase* célula madre hematopoyética.
CMM. *Véase* células madre mesenquimales.
CMPi. *Véase* células madre pluripotenciales inducidas.
complejo mayor de histocompatibilidad 20, 71.
cordón umbilical 21, 33, 34, 37, 39, 70, 75, 76, 91, 102.
cultivo 21, 25-27, 29, 31-36, 38, 40, 41, 45-66, 77, 87-96, 99-116.

D

diferenciación de CM 15-23, 26, 31-33, 34-36, 41-43, 46-49, 69, 75, 76, 85, 89-96, 99, 103, 107, 112.

E

enfermedades autoinmunes 20, 69, 80, 81.
enfermedades neurodegenerativas 69, 70, 76, 81, 84, 85.
ensayo de fármacos 25, 50, 53, 69, 80-82, 89, 91, 109.
esferoides. *Véase* agregados celulares.

G

generación de tejidos 16-22, 25, 47, 50, 51, 69, 74-79, 84, 85, 87.

H

hematopoyesis 15, 16, 20, 34.
hidrogel 49, 50, 71, 93-96.
homing 70.

I

ingeniería de tejidos 47, 50, 71, 75, 77, 79, 91.

L

linaje 16, 19, 21, 41, 42, 69, 89, 110.

M

matriz 26-28, 38, 42, 49, 51, 53, 93, 94.
 medicina regenerativa 19, 22, 47, 51, 53, 69-79.
 microambiente 16, 17, 20, 22, 25-27, 29, 47, 48, 50, 55, 80, 89, 90, 91,
 100, 107, 109, 110, 113.
 microgel 49, 50, 51.
 microportadores 55-60, 63-65, 103, 104, 106, 108, 109.
 migración celular 26-29, 48, 49, 70, 75, 76, 103.
 modelado 48, 53, 54, 55, 86, 87, 91.
 modulación 20, 31, 41, 46, 70, 71, 72, 74, 81, 100-102.

O

organoide 51, 52-55, 87.

P

potencialidad 17, 18-21, 22, 43, 59, 87, 114.
 precursores hematopoyéticos 16, 18, 19, 21, 34, 36, 42, 43, 76, 89.
 proliferación 15, 16, 18, 28, 31, 32, 38-40, 48, 49, 75, 76, 83-85, 87, 88,
 91, 97, 101, 102, 105, 112.
 purificación 32, 36, 38, 96.

R

ratones 15, 16, 22, 38, 54, 55, 72, 85.
 regeneración de tejidos. *Véase* generación de tejidos.
 remodelación 23, 28, 42, 49, 72, 75, 84, 87.
 replazo celular 69.
 respuesta inmune 20, 21, 26, 70, 73, 75, 80.

S

señalización 27, 28, 29, 49, 51, 70, 75, 76, 88, 90, 92, 93, 97, 100.

T

terapia celular 19, 20, 22, 25, 70-72, 76, 80-82, 84, 89, 90, 91, 108, 109.
 toxicidad 44, 50, 53, 89, 101.
 trasplante 20, 34, 43, 44, 49, 53, 54, 73, 78, 79, 80-83, 84, 85, 87, 100,
 101, 104, 105, 120.
 tumores 17, 22, 23, 82, 83, 86, 87, 89.

V

vascularización 53, 54, 55, 72, 75, 76, 78.
 viabilidad 34, 35, 43, 45, 58, 63, 65, 95, 103, 106-109.



Esta obra se editó en Ediciones USTA.
Tipografía de la familia Sabon.
2022

Colección
Ciencias de la salud

La capacidad autorregenerativa de las células madre es una de sus principales propiedades, la cual ha sido utilizada en procesos de regeneración celular, ya sea para reemplazo o para recuperación celular de tejidos y órganos. Estas células también tienen la habilidad de producir diferentes compuestos farmacológicos y toxicológicos. Así mismo, gracias a sus propiedades antiinflamatorias, antifibróticas regenerativas y antimicrobianas, se sitúan como un recurso biológico interesante. El objetivo de este libro es profundizar en los procesos moleculares y celulares de las células madre y mostrar sus diferentes usos biotecnológicos.



UNIVERSIDAD
SANTO TOMÁS
SEDE PRINCIPAL