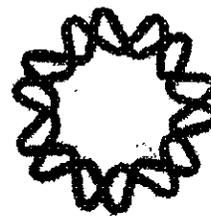




Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México



03088  
y  
Lef

**“Cultivo de células hematopoyéticas humanas  
suspendidas en reactores instrumentados: Utilidad de la  
velocidad de consumo de oxígeno y el potencial redox”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

**PRESENTA**

**M.B. ANTONIO DE LEON RODRIGUEZ**

Cuernavaca, Mor. mayo de 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

273764



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio T. Ramírez y la co-asesoría del Dr. Héctor Mayani. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN119398, PADEP 030527, PAEP-202338 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto 102-PM y con la beca 84201.

*A mi madre  
María de Jesús*

## *Dedicatoria*

*A mis hermanos: Francisco, Jesús<sup>†</sup>,  
J. Elena, Rosa, Berenice y Carmen.*

*Gracias por su apoyo incondicional.*

## *Reconocimientos*

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez, por todas sus valiosas enseñanzas y consejos que modelaron mi formación.

Al Dr. Héctor Mayani por todo el apoyo que me brindó para realizar este trabajo.

A mi comité tutorial por sus motivantes críticas,

Dr. Luis Covarrubias  
Dr. Héctor Mayani  
Dr. Tonatiuh Ramírez

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios,

Dr. Agustín López-Munguía  
Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez  
Dr. Héctor Mayani  
Dr. Rodolfo Quintero  
Dra. Ivonne Rosenstein  
Dr. Jean Louis Charli  
Dr. Fernando Esquivel

A Nancy Osorio por su indispensable colaboración.

A Claudia Berdugo y Edith López mis grandes compañeras de trabajo.

A mis amigos: Chalini, Francisco, Claudia, Rubén, Juan, Angélica, José Luis, Laura e hijo, J. Antonio, Male, Anabel, Laura I., Vera, Miranda, Gabo, Mauricio, Carlos Garay, Ronaldo y Arturo A.

A mis compañeros del Lab. 10 y del grupo de hematopoyesis del DF.

# Indice general

	Página
Indice de figuras	iv
Indice de tablas	vi
Nomenclatura	vii
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>1. Introducción</b>	5
1.1 Contribuciones	6
<b>2. Antecedentes</b>	7
2.1 La sangre: regulador homeostático	7
2.2 La hematopoyesis	8
2.2.1 Concepto de célula seminal hematopoyética	8
2.2.2 Células LTC-IC	9
2.2.3 Marcadores de selección	9
2.2.4 Progenitores hematopoyéticos	10
2.2.5 Eritropoyesis	11
2.2.6 Linfopoyesis	11
2.2.7 Mielopoyesis	12
2.2.8 Trombopoyesis	12
2.3 Microambiente hematopoyético	14
2.3.1 Factores hematopoyéticos: estimuladores e inhibidores	14
2.3.2 Interleucinas	15
2.3.3 Factores estimuladores de colonias y otros factores	16
2.3.4 Inhibidores de la hematopoyesis	17
2.4 Aplicaciones terapéuticas de las células hematopoyéticas	19
2.5 Fuentes de células hematopoyéticas	21
2.5.1. Células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical	21
2.6 Expansión de células hematopoyéticas	23
2.6.1 Expansión <i>in vitro</i> en cultivos estáticos	23
2.6.2 Cultivos en biorreactor	23

<b>3. Objetivos</b>	27
<b>4. Materiales y métodos</b>	28
4.1 Recolección de la sangre de cordón umbilical	28
4.2 Obtención de las células mononucleares (CMN)	28
4.3 Separación de células CD34 <sup>+</sup>	28
4.4 Obtención de células estromales de médula ósea humana	29
4.5 Medios de cultivo	30
4.6 Cultivos estáticos	30
4.7 Cocultivos estáticos cíclicos	30
4.8 Construcción del sistema de cultivo en biorreactor	31
4.9 Caracterización del minibiorreactor	33
4.10 Cultivos en biorreactor	33
4.11 Cultivos en frascos giratorios	34
4.12 Métodos analíticos	34
4.12.1 Concentración celular	34
4.12.2 Concentración de metabolitos	34
4.12.3 Ensayos clonogénicos	35
4.12.4 Determinación de citocinas	36
4.13 Definiciones	36
<b>5. Resultados y discusión</b>	37
5.1 Caracterización del medio de cultivo	37
5.2 Cinéticas de células estromales de médula ósea humana	39
5.3 Cultivos estáticos de células hematopoyéticas con y sin citocinas	44
5.4 Cinéticas de células hematopoyéticas y estromales en cocultivos estáticos por lote	44
5.5 Cocultivos cíclicos	51
5.6 Cultivos estáticos por lote a partir de células CD34 <sup>+</sup>	53
5.7 Modelamiento cinético de los cultivos a largo plazo	55
5.8 Diseño y caracterización del minibiorreactor	59
5.9 Cultivos agitados, utilidad de la medición en línea de variables secundarias como la VCO y el PRC	72
5.9.1 Utilidad de la velocidad de consumo de oxígeno	72

5.9.2 Monitoreo en línea del potencial redox y su utilidad en el cultivo de células hematopoyéticas	79
5.9.3 Desaparición de citocinas en los cultivos agitados	82
<b>5.10 Cultivos en frascos giratorios</b>	<b>85</b>
<b>6. Conclusiones y Recomendaciones</b>	<b>86</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>89</b>
<b>Apéndices</b>	<b>103</b>
A. Cocultivos de células estromales y células hematopoyéticas de SCU	103
B. Esquema del minibiorreactor	107
C. Cocultivo en biorreactor	108

## Indice de figuras

Figura	Página	
2-1	Esquema general de la hematopoyesis.	13
2-2	Expansión de UFC-GM utilizando diferentes combinaciones de citocinas.	20
2-3	Diagrama de las cámaras utilizadas en cultivos en perfusión.	24
4-1	Sistema de separación de células CD34 <sup>+</sup> mediante selección negativa.	29
4-2	Progenitores hematopoyéticos obtenidos mediante el ensayo clonogénico.	35
5-1	Descomposición espontánea de la glutamina y generación de amonio en medio IMDM al 10 % SFB y libre de células.	37
5-2	Reograma de los medios de cultivo utilizados.	38
5-3	Cultivo de células estromales de médula ósea humana (40x).	40
5-4	Cultivo confluyente de células estromales de médula ósea .	40
5-5	Cinética de crecimiento de células estromales de médula ósea.	41
5-6	Comparación del perfil de amonio en medio IMDM libre de células y en un cultivo de células estromales.	42
5-7	Rendimiento de lactato en el cultivo de células estromales.	42
5-8	Cinética de consumo y producción de aminoácidos en el cultivo de células estromales.	43
5-9	Cultivos de células hematopoyéticas con y sin citocinas.	44
5-10	Cultivo de células hematopoyéticas en medio sin citocinas (40x).	45
5-11	Cultivo de células hematopoyéticas en medio con citocinas (40x).	45
5-12	Cocultivo de células estromales y células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical al inicio del cultivo (10x).	47
5-13	Cinéticas de expansión de células hematopoyéticas en diferentes estromas.	48
5-14	Máxima expansión celular y de progenitores hematopoyéticos totales en los cultivos con y sin estroma en diferentes medios de cultivo.	50
5-15	Cinética de crecimiento en los cocultivos con tres ciclos.	52
5-16	Cultivos estáticos por lote a partir de un inóculo de células CD34 <sup>+</sup> .	54
5-17	Cultivo lote cíclico de células hematopoyéticas a partir de células CD34 <sup>+</sup> .	54
5-18	Metodología de los cultivos a largo plazo.	55
5-19	Modelamiento cinético de los cultivos a largo plazo.	57
5-20	Ajuste de los datos experimentales de Mayani y col. (1998) al modelo cinético.	58

5-21	Ajuste de los datos experimentales de Koller y col. (1992) al modelo cinético.	58
5-22	Perfil de VCO y cinética de crecimiento de progenitores en cultivos a OD constante.	74
5-23	Correlación entre VCO y la concentración de progenitores hematopoyéticos durante la fase exponencial.	76
5-24	Dispositivo para medir la VCO por el método dinámico.	77
5-25	Determinación de la VCO por el método dinámico para la muestra de SCU número 1.	78
5-26	Evolución del PRC en un cultivo de células hematopoyéticas bajo condiciones controladas.	80
5-27	Correlación entre la concentración celular y el potencial redox del medio de cultivo.	81
5-28	Cinética de desaparición de citocinas durante un cultivo agitado en biorreactor.	84
5-29	Cultivo lote de células hematopoyéticas en frasco giratorio.	85
A-1	Cocultivo de células hematopoyéticas en estroma de médula ósea humana.	103
A-2	Cocultivo de células hematopoyéticas en estroma de médula ósea.	104
A-3	Cocultivo de células hematopoyéticas y estroma híbrido.	105
A-4	Cocultivo de células hematopoyéticas en estroma de médula ósea humana.	106
B-1	Esquema de las dimensiones del minibiorreactor.	107
C-1	Cultivo por lote de células hematopoyéticas a 10 % OD y medio IMDM-cit en biorreactor.	108

**Indice de tablas**

Tabla		Página
2-1	Propiedades fisicoquímicas de la sangre.	7
2-2	Las células de la sangre y sus funciones.	8
2-3	Estimación de la velocidad de producción celular <i>in vivo</i> .	8
2-4	Componentes propios y asociados de la matriz extracelular.	14
2-5	Características funcionales de diferentes factores hematopoyéticos.	15
2-6	Características de las fuentes disponibles de células hematopoyéticas humanas.	22
4-1	Composición de los medios enriquecidos.	31
4-2	Citocinas utilizadas para el medio IMDM-Cit.	31
5-1	Velocidad específica de crecimiento obtenida por el modelo cinético para diferentes muestras de células hematopoyéticas.	59
5-2	Valores experimentales de VCO y concentración de células formadoras y no formadoras de colonias.	76
5-3	Comparación entre la concentración de progenitores hematopoyéticos totales obtenida por el ensayo clonogénico y mediante el método de respiración.	78
5-4	Valores reportados en la literatura de las constantes a y b.	81

## Nomenclatura

a	Constante de regresión	(-)
b	Constante de regresión	(-)
CFC	Células formadoras de colonias	
$C_L$	Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo	(mg O <sub>2</sub> /L)
$C_g^*$	Concentración de oxígeno disuelto en agua a la saturación con aire	(mg O <sub>2</sub> /L)
CMN	Células mononucleares	
CSF	Factor estimulador de colonias	
CSH	Célula seminal hematopoyética	
$D_i$	Diámetro del impulsor	(m)
$D_T$	Diámetro del tanque	(m)
E-	Eritroides	
$E_n$	Error actual	(%)
$E_{n-1}$	Error anterior	(%)
$E_{n-2}$	Error anterior a dos tiempos	(%)
Epo	Eritropoyetina	
Est	Estroma	
f	Factor de recambio	
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	
Flt-3	Ligando del receptor Flt-3	
G-	Granulocitos	
GEMM-	Granulocitos- Eritroides- Macrófagos- Megacariocitos	
GM-	Granulocitos- Macrófagos	
HC	Hormona de crecimiento	
IFN- $\gamma$	Interferón gamma	
IL-x	Interleucina-x	
IMDM	Medio de Dulbecco modificado por Iscove	
Kc	Constante proporcional	(-)
$k_{La}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	(h <sup>-1</sup> )
LIF	Factor inhibidor de la leucemia	
Lin	Linfoma	
LTC-IC	Células iniciadoras de cultivos a largo plazo	
M-	Macrófagos	
MCF	Medio condicionado por células estromales	
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa	

MTC	Medio MethoCult GF H4434 (StemCell)	
NO	Oxido nítrico	
Np	Número de potencia	(-)
O <sub>2</sub> %	Flujo de oxígeno actual	(% del total)
O <sub>2</sub> % <sub>n-1</sub>	Flujo de oxígeno anterior	(% del total)
Pla	Placenta	
PRC	Potencial redox del cultivo	mV
qo <sub>2</sub>	Velocidad específica de consumo de oxígeno	(mg O <sub>2</sub> /cel.h)
SCF	Factor de células seminales	
SCU	Sangre de cordón umbilical	
SFB	Suero fetal de bovino	
t	Tiempo	(h)
Td	Tiempo muerto	(s)
TGF- β	Factor transformador del crecimiento beta	
t <sub>m</sub>	Tiempo de mezclado	(s)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa	
TOD	Tensión de oxígeno disuelto	(%)
Tpo	Trombopoyetina	
UFC	Unidades formadoras de colonias	
V	Volumen	(mL)
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno	(μM O <sub>2</sub> /h)
V <sub>o</sub>	Volumen inicial	(mL)
V <sub>r</sub>	Volumen después del recambio	(mL)
VRS	Velocidad máxima de respuesta	(%/s)
Y	Vector de coeficientes	
Z	Matriz de coeficientes	

### Letras griegas

Θ	Tiempo de recambio	(d)
μ	Velocidad específica de crecimiento	(d <sup>-1</sup> , h <sup>-1</sup> )
φ	Tiempo de control	(s)
η	Dilución aparente	(d <sup>-1</sup> )
τ <sub>d</sub>	Constante derivativa	(s)
τ <sub>i</sub>	Constante integral	(s)

## Resumen

En años recientes, las células hematopoyéticas provenientes de la sangre de cordón umbilical han sido consideradas como una importante fuente alternativa a la médula ósea, para transplantes en el tratamiento de anemias congénitas, leucemias y otras patologías. Sin embargo, debido a la naturaleza de las muestras, la cantidad de células hematopoyéticas recuperadas es limitada. En la actualidad, con apoyo de las técnicas de biología molecular, un buen número de protocolos de terapia génica utilizan las células hematopoyéticas para introducir genes en el organismo. Adicionalmente se ha planteado la producción de células sanguíneas maduras como eritrocitos y plaquetas para transfusiones. Todo esto, ha motivado el desarrollo e investigación relacionada con la expansión de las células hematopoyéticas *in vitro*. Los cultivos estáticos a largo plazo resultaron pioneros para el estudio de la hematopoyesis *in vitro*. Sin embargo, estos cultivos son inherentemente de volúmenes reducidos, con poca utilidad clínica para este objetivo. Por el contrario, los cultivos en biorreactor presentan una serie de características muy favorables para su aplicación clínica, por ejemplo, son escalables, fáciles de instrumentar y de monitorear automáticamente.

Recientemente se ha reportado el uso de biorreactores inmovilizados en lecho empacado o en microsferas para la expansión de células hematopoyéticas. Sin embargo, estos sistemas no son homogéneos, la instrumentación es complicada y las células requieren ser liberadas mediante tratamientos que afectan su viabilidad. Los cultivos de células en suspensión superan estas limitaciones, no obstante, su utilización es aún muy limitada y no se ha reportado el monitoreo en línea de variables como la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) y cambios en el potencial redox del cultivo (PRC), las cuales son de gran utilidad en la ingeniería de cultivos para optimizar procesos.

En este trabajo se diseñó y construyó un minibiorreactor para cultivar células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical bajo condiciones controladas de temperatura, pH y oxígeno disuelto. Se evaluó el cultivo de células hematopoyéticas en suspensión con este sistema y en frascos giratorios. Simultáneamente, se realizaron cultivos estáticos como referencia y se evaluó la utilidad de las células estromales para mejorar la expansión de las células hematopoyéticas en cocultivos por lote y cíclicos.

No se observó expansión celular ni de progenitores en los cocultivos de células hematopoyéticas y estroma alogénico sin citocinas exógenas. Cuando se utilizó medio con citocinas, no se observó efecto del estroma sobre la expansión celular y de progenitores hematopoyéticos.

Respecto a los cocultivos cíclicos, fue posible realizar hasta 3 ciclos de cultivo, logrando una expansión celular calculada de  $277 \pm 170$  y para los progenitores hematopoyéticos de  $15 \pm 7.9$  veces, respectivamente.

Los cultivos en el minibiorreactor y en frascos giratorios presentaron una expansión celular ligeramente menor que los cultivos estáticos. Por el contrario, la expansión de los progenitores hematopoyéticos fue mayor en los cultivos en suspensión. Con el minibiorreactor fue posible monitorear en línea la VCO y el PRC, situación que no se ha reportado para el cultivo de células hematopoyéticas. Con las variables adquiridas en línea (PRC y VCO), se establecieron correlaciones para determinar la concentración celular y de progenitores hematopoyéticos en tiempo real. Esto constituye un método novedoso y potencialmente útil para predecir la concentración de progenitores hematopoyéticos en forma rápida (menos de 30 min), mientras que el método tradicional en medio semisólido requiere de 14 días. Con los datos de respiración y PRC, se propuso un modelo de dos poblaciones (células formadoras de colonias y células no-formadoras de colonias), que se ajustó muy bien a los datos experimentales. El modelo sugiere que los progenitores hematopoyéticos tienen mayor actividad metabólica que las células más diferenciadas.

Los cultivos en suspensión mediante biorreactores agitados y en frascos giratorios son una alternativa muy atractiva para realizar cultivos de células hematopoyéticas en volúmenes con utilidad en la clínica.

El estudio de expansión de células hematopoyéticas humanas descrito en este trabajo, representa un esfuerzo pionero dentro de los grupos nacionales de investigación y constituye el primer reporte en donde se correlaciona la concentración de células hematopoyéticos con variables de proceso como la VCO y el PRC.

## Abstract

Hematopoietic cells from umbilical cord blood (UCB) have been used as an important alternative to bone marrow transplant in Fanconi's anemia, leukemia and other pathologies. However, the amount of hematopoietic cells available from this source is limited. Nowadays, with the aid of molecular biology techniques, many protocols for gene therapy use hematopoietic cells to introduce genes into the human body. These applications demand high quantities of hematopoietic cells. Also a high cell concentration of mature cells, such as erythrocytes and platelets for transfusion, is required. Traditionally, long-term cultures have been widely used as an experimental tool for the study of hematopoiesis *in vitro*. However, static cultures are inherently performed at low volumes and thus are inadequate for large volume expansion. In contrast, bioreactor cultures have several advantages for clinical applications, namely, they are scalable, can be instrumented and monitored automatically.

Expansion of hematopoietic cells in immobilized systems has been recently demonstrated, using perfusion bioreactors, microcarrier and cells microencapsulated in alginate beads. However, several limitations and disadvantages persist. For instance, harvesting cells from these systems, can be an important problem; the systems are inherently heterogeneous and difficult to sample, monitor and control. In contrast, freely suspended cultures in instrumented stirred-tank bioreactors are suitable for maintaining an homogeneous environment. Nonetheless, very scarce information exists on the use of instrumented and controlled bioreactors for expansion of hematopoietic cells. Even though variables such as culture redox potential (CRP) and oxygen uptake rate (OUR) have been used to optimize several cultures in bioreactors. No reports of on-line monitoring of hematopoietic cell cultures exist to date.

In this work, the design, characterization and application of an instrumented minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells from umbilical cord blood was studied. Expansion of hematopoietic cells was evaluated in suspension cultures using roller-bottles and stirred-tank bioreactors; static batch cultures were performed simultaneously as controls.

In order to increase hematopoietic cell expansion, static batch and cyclic coculture with stromal cells were performed. No improvement in cell and progenitor expansion was observed during cocultures without cytokines. No effect was observed when cocultures were performed in medium where cytokines were added. In static batch cyclic cocultures, a cell expansion of  $277 \pm 170$  fold and progenitor expansion of  $15 \pm 7.9$ -fold, were obtained.

A minor cell expansion was obtained in roller-bottles and stirred-tank bioreactors with respect to static cultures. However, the expansion of hematopoietic progenitors was higher in suspended cultures. On-line monitoring of CRP and OUR was achieved with the aid of a minibioreactor specially designed for hematopoietic cell expansion. A linear correlation between OUR and progenitor cell concentration was obtained, showing the utility of OUR in the quantification of progenitor cells in real-time. In comparison, the standard methylcellulose-based semisolid cultures require two weeks to detect progenitors. This novel method can be applied for estimating the concentration of hematopoietic progenitors, both off- and on-line. Also, a two-population model was used to describe OUR and CRP behavior. The model suggests that progenitor cells have a higher metabolic activity than more differentiated cells.

The results demonstrated that the suspended cultures of human hematopoietic cells using roller-bottles and stirred-tank bioreactors are adequate for large volume expansion used in clinical application.

The study of human hematopoietic cell expansion described in this work, is a novel research line in Mexico. Even more, this work includes the first report where process variables such as CRP and OUR were correlated with the hematopoietic progenitors concentration.

# **Capítulo I**

## **Introducción**

La hematopoyesis es el proceso por el cual se producen todas las células de la sangre. Para lograr satisfacer la demanda del organismo y mantener una población constante, se requiere producir hasta  $383 \times 10^9$  cel/d (Koller y Palsson, 1993). Esto ubica a la hematopoyesis como el proceso con la mayor tasa de crecimiento celular en los vertebrados. Esta misma capacidad prolífica, hace vulnerable a la hematopoyesis a procedimientos clínicos, como la quimio y radioterapia, utilizados en el tratamientos de diversos tipos de cáncer. Adicionalmente, existe una serie de patologías que afectan al sistema hematopoyético, como los diversos tipos de leucemias, anemias congénitas y talasemias, las cuales son padecimientos potencialmente letales. Actualmente, la forma de restablecer la homeostasis consiste en realizar trasplantes de médula ósea, posterior a tratamientos mieloablativos. Sin embargo, contar con un donador compatible y contender con los problemas de rechazo, que llegan a atentar contra la vida del paciente, siguen siendo un problema clínico. Adicionalmente a los problemas mencionados, la donación de médula ósea resulta en un traumatismo para los donantes. En la búsqueda de alternativas a la médula ósea, en la actualidad se cuenta con la obtención de células hematopoyéticas a partir de sangre periférica, en donde las células movilizadas son colectadas mediante técnicas de aféresis. Sin embargo, este procedimiento requiere de equipo muy costoso, lo que limita su aplicación a un número restringido de pacientes.

Recientemente se demostró que la sangre de cordón umbilical –un tejido de desecho-, cuenta con un número significativo de células hematopoyéticas, lo cual llevó a pensar en el potencial de la sangre de cordón umbilical como una fuente alternativa muy importante a la médula ósea (Knudtzon, 1974; Koller y col. 1992; Mayani y Landsdorp 1994). Sin embargo, la cantidad de células hematopoyéticas provenientes de la sangre de cordón umbilical es escasa y ha sido utilizada principalmente en el tratamiento de infantes (Gluckman y col., 1989). Adicionalmente, con los adelantos en las técnicas de biología molecular y terapia génica, que utilizan a las células hematopoyéticas como vector para introducir genes funcionales en el organismo, será necesario desarrollar procesos que permitan expandir células hematopoyéticas en cantidad suficiente para su aplicación en la clínica. Se ha propuesto que los cultivos de células hematopoyéticas también podrán ser utilizados para producir células sanguíneas maduras como eritrocitos y plaquetas para transfusiones.

Con el cultivo *in vitro* de células hematopoyéticas se busca incrementar el número de células hematopoyéticas de muestras limitadas, tal como la sangre de cordón umbilical. En este punto, se han propuesto diversas estrategias de cultivo para lograr la expansión *in vitro*. Inicialmente los cultivos estáticos tipo “Dexter”, resultaron pioneros para este objetivo. No obstante, los volúmenes de trabajo son tradicionalmente de 1 a 10 mL, que no son de utilidad a nivel clínico.

Los cultivos en biorreactor son sistemas que presentan una serie de características muy favorables como el hecho de ser escalables, más fáciles de instrumentar y manipular. Al respecto se han propuestos los reactores de perfusión, reactores agitados con células libres o inmovilizadas en microcápsulas o en microacarreadores. Los reactores con células inmovilizadas tienen el inconveniente de que para liberar a las células se requiere de un procesamiento postcultivo que afecta a las células.

En este trabajo se diseñó y caracterizó un minibiorreactor agitado e instrumentado con sensores de pH, OD y potencial redox, para cultivar células hematopoyéticas humanas libres y en suspensión. El reactor construido supera las ventajas de los sistemas descritos al operar como un sistema con las células en suspensión. Mediante la implementación del control automático se pueden medir variables en línea como la velocidad de consumo de oxígeno, cambios en el potencial redox e inferir a partir de estas, la concentración celular y de progenitores hematopoyéticos, situación que no se ha reportado hasta ahora en la literatura.

## 1.1 Contribuciones

Este trabajo tiene tres aportaciones relevantes:

- 1.- El diseño y caracterización de un minibiorreactor instrumentado y homogéneo para el cultivo de células hematopoyéticas humanas en suspensión.
- 2.- Demostrar la utilidad del monitoreo en línea de variables como la velocidad de consumo de oxígeno y el potencial redox del cultivo, mediante los cuales se puede inferir, además del estado del biorreactor, la concentración celular y de progenitores hematopoyéticos en forma rápida y continua.
- 3.- La propuesta de modelos matemáticos de dos poblaciones para explicar la respiración y los cambios en el PRC en los cultivos en biorreactor y un modelo para explicar el comportamiento cinético de los cultivos a largo plazo.

Adicionalmente se realizaron algunos estudios en frascos giratorios, cocultivos estáticos y una caracterización reológica preliminar de los medios de cultivo utilizados.

## Capítulo II

### Antecedentes

#### 2.1 La sangre: regulador homeostático

La sangre es el tejido encargado de los procesos de transporte y homeóstasis en los animales vertebrados. La sangre está compuesta por dos fracciones de composición y organización muy compleja. La primera es una fracción líquida que se encarga del transporte de nutrimentos y de células, regular la temperatura y el pH corporal. Esto ocurre, gracias a las propiedades fisicoquímicas de la sangre que se resumen en la **tabla 2.1**. La otra fracción está compuesta de elementos celulares, en donde se han identificado a la fecha hasta nueve tipos de células diferenciadas que circulan en la sangre o que se encuentran en tejidos específicos. Una forma de clasificar a las células, consiste en agruparlas en dos familias en función de su origen; la linfoide y la mieloide. La **tabla 2.2** incluye una clasificación de las células y sus funciones. Cada una de estas especies celulares tiene funciones muy específicas y vitales para el organismo. Por ejemplo, los eritrocitos son células especializadas en el transporte de oxígeno desde los pulmones hacia todos los tejidos del cuerpo. Los leucocitos conforman una vasta línea de defensa contra agentes extraños al organismo, conocida como respuesta inmune y los trombocitos o plaquetas participan en el mecanismo de coagulación ante la presencia de traumatismos en el individuo.

**Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas de la sangre**

Propiedad	Valor
Viscosidad	4.5 a 5.5 mPa.s
Temperatura	37-38°C
pH	7.35 a 7.45
Salinidad	0.85 a 0.9 %
Proporción del peso corporal	8 %
Volumen (hombres)	5 a 6 L
Volumen (mujeres)	4 a 5 L
Fracción líquida	50 a 60 %

**Tabla 2.2. Las células de la sangre y sus funciones.** El grupo de los leucocitos está formado por linfocitos, monocito, células NK y granulocitos.

Familia	Tipo celular	Subdivisiones	Función
Linfoide	Linfocitos T	Cooperadores	Modulan la respuesta inmune
		Citotóxicos	
	Linfocitos B		Producción de anticuerpos
	Células NK		Citotoxicidad celular
Mieloide	Eritrocitos		Transporte de oxígeno y CO <sub>2</sub>
	Plaquetas		Coagulación
	Monocitos		Fagocitosis
	Granulocitos	Neutrófilos	Fagocitosis
Basófilos		Inmunidad tardía, alergias	
Eosinófilos		Antiparasitarios, alergias	

## 2.2 La hematopoyesis

### 2.2.1 Concepto de célula seminal hematopoyética

Debido al limitado ciclo de vida de las células sanguíneas (**tabla 2.3**), todas las líneas celulares deben regenerarse continuamente. A este proceso se le conoce como hematopoyesis. La ubicación de este proceso se modifica durante el tiempo de vida del individuo. En la etapa embrionaria, los órganos hematopoyéticos son: el saco vitelino, hígado, bazo, timo, ganglios linfáticos y la médula ósea. Sin embargo, en la etapa adulta, el proceso se reduce a la médula ósea.

**Tabla 2.3. Estimación de la velocidad de producción celular *in vivo* (Koller y Palsson, 1993).**

Tipo celular	Concentración (cel/mL)	Tiempo de vida media (d)	Producción (10 <sup>9</sup> cel/d)
Eritrocitos	5 x 10 <sup>9</sup>	120	208
Plaquetas	2 x 10 <sup>8</sup>	8	125
Leucocitos	5 x 10 <sup>6</sup>	0.5 días - varios años	50
Total			383

En las últimas décadas se han realizado una serie de estudios que demuestran que todos los elementos celulares presentes en la sangre circulante provienen de un progenitor común: la célula seminal hematopoyética (CSH) o *stem cell*. Esta célula se caracteriza por la capacidad que tiene de autoreplicarse y de diferenciarse para dar origen a todas las células sanguíneas. El proceso hematopoyético no es del todo conocido, sin embargo, se sabe que la CSH da origen a diferentes progenitores hematopoyéticos incapaces de autoreplicarse, pero con una alta capacidad prolífica. Los progenitores hematopoyéticos durante la proliferación adquieren características que los comprometen a cierta línea celular, generando precursores que al madurar dan origen a las células de la sangre (**figura 2.1**).

### 2.2.2 Células LTC-IC

Como se mencionó, la CSH tiene las características de autoreplicarse y la capacidad de sostener la hematopoyesis a largo plazo. No obstante, hasta la fecha no ha sido posible aislar a la CSH. Hasta el momento, la forma que se tiene de demostrar *in vitro* dichas características, es mediante la realización de los cultivos denominados a largo plazo, diseñados por Dexter y col. (1977). Estos cultivos se realizan utilizando una capa de células adherentes que nutren de algunos factores a las células hematopoyéticas. La capacidad de sostenimiento de la hematopoyesis se mide por la generación de progenitores después de al menos 5 semanas de cultivo. A las células con esta capacidad se les denomina células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC, *long-term culture-initiating cells*). Este método es al momento la forma estandar de mostrar la capacidad de sostenimiento de la hematopoyesis de un cultivo *in vitro*. Recientemente, se ha tratado de definir marcadores de superficie para identificar a la CSH.

### 2.2.3 Marcadores de selección

Los marcadores de superficie utilizados para el reconocimiento de la CSH, pueden ser combinaciones muy variadas, dependiendo del juicio de los autores. Principalmente se menciona a CD34<sup>+</sup>, una proteína que participa en los mecanismos de adhesión, como principal marcador de la CSH. No obstante, la población de células CD34<sup>+</sup>, es muy heterogénea e incluye a fibroblastos, células endoteliales y progenitores hematopoyéticos. Se ha mencionado al antígeno Thy-1 como un marcador de poblaciones muy primitivas (Mayani y Lansdorp, 1994). En la actualidad se han reportado trabajos con fracciones celulares tales como CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> (Zannettino y col. 1998); CD34<sup>+</sup> CD59<sup>+</sup> (Hill y col., 1996); CD34<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> NhL<sup>-</sup> (Verfaillie, 1993); CD34<sup>+</sup> CD45RA<sup>bajo</sup> CD71<sup>bajo</sup> (Mayani y col., 1993), CD34<sup>+</sup> Lectin<sup>+</sup> (Pipia y Long, 1997), entre otras. Yin y col. (1997) reportaron que las células que muestran la

proteína AC133, tienen un gran poder proliferativo, por lo cual puede ser considerada también como uno de los marcadores de la CSH. Zannettino y col. (1998) reportaron una población conteniendo el antígeno CD164, una glicoproteína que participa en el proceso de adhesión de los progenitores hematopoyéticos sobre las células estromales. Dichos autores demostraron que al bloquear a CD164, la expansión de las células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>, es menor. Esto sugiere que CD164 representa un potente receptor para suprimir la proliferación de las células hematopoyéticas.

En base a la información disponible se puede suponer que la CSH puede tener un fenotipo tan complejo como: CD34<sup>+</sup>, Thy-1<sup>+</sup>, Rhoda<sup>bajo</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>, C-kit<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD59<sup>+</sup>, AC133<sup>+</sup>, C164<sup>+</sup>. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que una fracción de células humanas CD34<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>, presenta un alto poder de proliferación y se ha demostrado que es capaz de reconstituir el sistema hematopoyético en modelos de ratón (Bhatia y col., 1998).

#### 2.2.4 Progenitores hematopoyéticos

Los progenitores hematopoyéticos son células provenientes de la CSH que son capaces de generar colonias en medios semisólidos. En la actualidad el ensayo clonogénico es el método estandar para cuantificar los progenitores hematopoyéticos *in vitro*. El ensayo se lleva acabo en un medio con metilcelulosa, rico en nutrimentos y en factores de crecimiento. Estos cultivos tienen como finalidad la de promover el desarrollo de colonias que son clasificadas en base a sus propiedades morfológicas. Los progenitores hematopoyéticos que se pueden observar son las unidades formadoras de colonias de granulocitos (UFC-G), unidades formadoras de colonias de macrófagos (UFC-M), unidades formadoras de colonias de eritrocitos (UFC-E). A estos progenitores se les conoce como progenitores tardíos. Los progenitores tempranos son las unidades formadoras *burst* muy primitivas de eritrocitos (UFB-E), unidades formadoras de granulocitos y de macrófagos (UFC-GM). Las unidades formadoras de granulocitos-eritrocitos-macrófagos y megacariocitos (UFC-GEMM) o colonias mixtas (UFC-Mix) son los progenitores hematopoyéticos más primitivos que pueden observarse en cultivo. Las unidades formadoras de colonias con alto poder proliferativo (UFC-HPP), son progenitores muy primitivos de células GM (Collins y col. 1997; Mayani y col., 1993; Mayani y col. 1998).

Los progenitores de megacariocitos (UFC-Mk) son identificados utilizando un medio con matriz de colágeno, y factores como Tpo, IL-3 y IL-6. Posteriormente se realiza un ensayo de inmunocitoquímica utilizando como marcador a CD41 presente en los megacariocitos y que permite distinguir a los megacariocitos de los macrófagos (Bertolini y col. 1997).

### 2.2.5 Eritropoyesis

La eritropoyesis es el proceso por el cual se generan los eritrocitos. La primera célula eritroide que se puede reconocer morfológicamente es el pronormoblasto que es una célula grande con cromatina ligeramente aglutinada y nucleolos. Esta célula da origen a normoblastos más pequeños que contienen mayor cantidad de hemoglobina. Finalmente, el núcleo es excluido del normoblasto dando origen a reticulocitos, los cuales contienen cierta cantidad de RNA y son capaces de producir hemoglobina. Los reticulocitos permanecen de 1 a 2 días más en la médula ósea o circulando en sangre periférica antes de madurar, principalmente en el bazo, cuando el RNA desaparece por completo y dan origen a eritrocitos maduros (**figura 2.1**). Generalmente de un pronormoblasto se obtienen 16 glóbulos rojos. Debido a la gran cantidad de eritrocitos que se generan cada día, la médula ósea requiere de muchas sustancias y hormonas para sintetizar la hemoglobina, tales como hierro, manganeso, cobalto, vitaminas, tiroxina y eritropoyetina. Esta última es la proteína responsable de la estimulación y regulación de la eritropoyesis. El estímulo para la producción de la eritropoyetina es la tensión de oxígeno disuelto en los tejidos del riñón (Hoffbrand y Pettit, 1991), mientras que el TGF- $\beta$  es un potente inhibidor de la eritropoyesis (Dybedal y Jacobsen, 1995). En los estudios *in vitro* que se han realizado, se ha demostrado que las bajas tensiones de oxígeno disuelto favorecen el desarrollo de las colonias eritroides E-CFU y E-BFU (Rich y Kubanek, 1982).

### 2.2.6 Linfopoyesis

La linfopoyesis es el mecanismo por el cual se generan las células T, B y NK. En la etapa fetal ocurre en el saco vitelino, hígado y bazo. En la vida postnatal la linfopoyesis ocurre en la médula ósea y el timo que son considerados como los órganos linfopoyéticos primarios. En estos órganos ocurre la proliferación no dependiente de antígenos (**figura 2.1**). Los órganos linfopoyéticos secundarios son el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos linfoides, en donde ocurre la proliferación antígeno-dependiente (Hoffbrand y Pettit, 1991). Los factores linfopoyéticos más importantes son IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12 y factores no definidos producidos en el timo. Se ha mencionado que IL-7 participa de manera importante en los mecanismos de proliferación, diferenciación y sobrevivencia de los precursores de los linfocitos B (LeBien, 1998).

Recientemente se reportó el cultivo a gran escala de células NK, de sangre periférica, estimuladas con IL-2 (Pierson y col., 1996).

### **2.2.7 Mielopoyesis**

La mielopoyesis es el proceso por el que se generan los leucocitos granulados (granulopoyesis) y la monocitopoyesis. En particular, se sabe que el neutrófilo y el monocito provienen del mismo precursor la UFC-GM. En la serie granulocítica, el mieloblasto, el promielocito y el mielocito constituyen un grupo de células mitóticas, mientras que los metamielocitos, las células en banda y segmentadas constituyen un grupo celular de maduración post-mitótica.

Durante la generación de monocitos, el monoblasto madura a promonocito, el cual da origen al monocito (**figura 2.1**). Estas células permanecen un tiempo muy corto en la médula ósea, y después de circular por un período de 20 a 40 h, abandonan la sangre para introducirse en los tejidos en donde maduran y efectúan sus funciones. Su existencia extravascular como macrófagos puede prolongarse por meses e incluso años (Hoffbrand y Pettit, 1991).

Se han reportado algunos trabajos en donde se pretende expandir en forma individual a células mieloides. Por ejemplo, Furitsu y col., (1989), obtuvieron una gran densidad celular de mastocitos cuando cocultivaron células de sangre de cordón umbilical con fibroblastos de ratón 3T3. Posteriormente, Saito y col., (1996) reportaron el crecimiento selectivo de mastocitos a partir de sangre de cordón umbilical utilizando SCF, IL-6 y prostaglandina E<sub>2</sub>.

### **2.2.8 Trombopoyesis**

Las plaquetas o trombocitos se producen en la médula ósea al fragmentarse el citoplasma de los megacariocitos. El precursor es el megacarioblasto que surge por un proceso de diferenciación de la CSH. El megacarioblasto madura mediante un proceso de reproducción nuclear sincrónica endomitótica, aumentando el volumen del citoplasma en la medida que aumentan el número de núcleos en múltiplos de 2. Cuando el núcleo contiene al menos 8 fragmentos, la reproducción nuclear cesa, entonces el citoplasma se torna granular y se liberan las plaquetas (**figura 2.1**). Cada megacariocito da origen a aproximadamente 4000 plaquetas y se ha estimado que el proceso requiere de aproximadamente 10 días (Hoffbrand y Pettit, 1991).

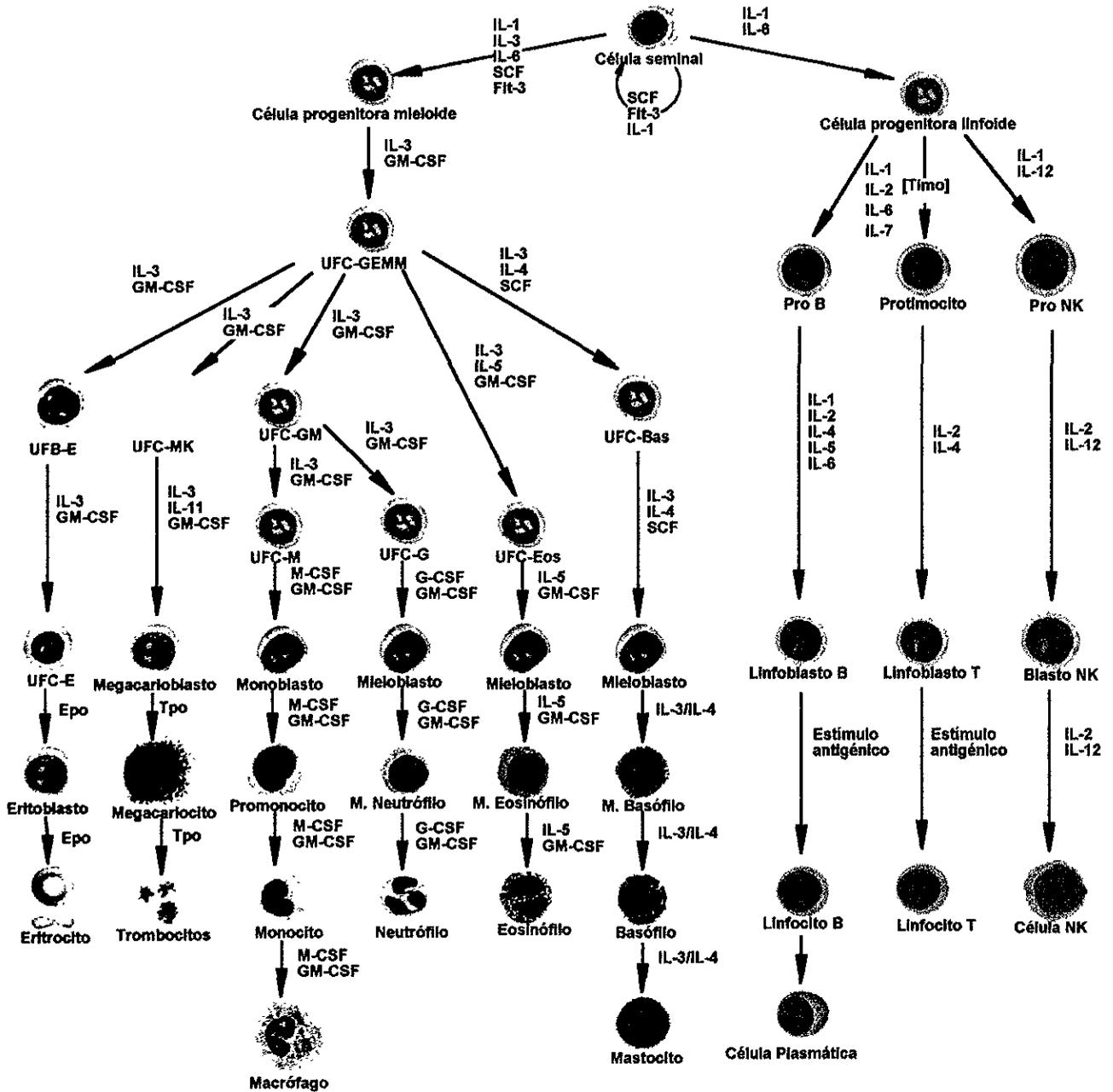


Figura 2.1 Esquema general de la hematopoyesis.

## 2.3 Microambiente hematopoyético

La hematopoyesis ocurre en un microambiente constituido por células estromales (fibroblastos, adipocitos, macrófagos y células endoteliales), células accesorias (monocitos y linfocitos T), sus productos (matriz extracelular y citocinas) y hormonas provenientes de otros órganos. La **tabla 2.4** resume algunos de los componentes de la matriz extracelular. El estroma es una compleja red celular encargada de regular la proliferación de las células hematopoyéticas (Mayani y col., 1992). Dada la participación que tiene el estroma *in vivo*, se ha tratado de reproducir el evento en los cultivos *in vitro*, ya sea mediante la generación endógena del estroma en el caso de médula ósea (Mayani y col., 1998), o bien utilizando estromas preformados a partir de líneas celulares murinas (Furitsu y col., 1989) o bien de médula ósea (Verfaillie, 1993).

**Tabla 2.4 Componentes propios y asociados de la matriz extracelular.**

Grupo	Ejemplo	Función
Proteoglicanos	Betaglicano Sindecano-1	Unión a TGF- $\beta$ Adhesión celular, unión a FGF
Proteínas mayores	Colágeno Elastina Laminina Fibronectina	Adhesión Soporte
Citocinas (asociados)	Factores estimuladores Interleucinas	Crecimiento celular

### 2.3.1 Factores hematopoyéticos: estimuladores e inhibidores

Los factores estimuladores e interleucinas son un conjunto de proteínas que tienen la función de inducir la mitosis, desencadenar la cascada de diferenciación celular y en la sobrevivencia celular. Por el contrario, los inhibidores inducen la muerte celular programada, como parte del mecanismo de regulación en el desarrollo celular. Un estudio de estas funciones fue reportado por Cowling y Dexter (1994) y se resume en la **tabla 2.5**.

**Tabla 2.5 Características funcionales de diferentes factores hematopoyéticos (Cowling y Dexter, 1994).** \* no es un factor de crecimiento, +: inductor, -: supresor, ?: se desconoce.

Factor de crecimiento	Proliferación	Sobrevivencia	Actividad apoptótica
IL-1	+	+	-
IL-2	+	?	-
IL-3	+	+	-
IL-5	+	+	-
IL-6	+	+	-
GM-CSF	+	+	-
G-CSF	+	+	-
M-CSF	+	?	-
Epo	+	+	-
SCF	+	+	-
MIP-1 $\alpha$	-	?	-
IFN- $\gamma$	-	+	-
Antígeno FAS *	?	?	+
TGF- $\beta$	-	-	+

### 2.3.2 Interleucinas

*Interleucina 1 (IL-1)*: Fue primeramente definida como una IL proveniente de los macrófagos, aunque en la actualidad se sabe que también es producida por los fibroblastos. Se cree que actúa en los niveles muy tempranos de la hematopoyesis, a nivel de la replicación de la célula seminal y en el crecimiento de linfocitos B, también participa en los procesos de inmunidad natural.

*Interleucina 2 (IL-2)*: Es la principal citocina que induce el crecimiento, diferenciación y activación de los linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>). Estimula el crecimiento de las células NK e incrementa su actividad citolítica, produciendo las células asesinas linfocino-activadas o células LAK. IL-2 actúa sobre los linfocitos B tanto como factor de crecimiento como en el estímulo para secretar anticuerpos.

*Interleucina 3 (IL-3)*: Es una citocina con actividad sobre los progenitores hematopoyéticos más primitivos, por lo que se le conoce como factor multipotente. IL-3 es producida por los

linfocitos  $T_H1$  y  $T_H2$ , se ha reportado que promueve importantemente el crecimiento y desarrollo de los mastocitos, una función que es incrementada por IL-4.

*Interleucina 4 (IL-4)*: Es producida por los linfocitos T; participa en el crecimiento y diferenciación de granulocitos basófilos y del linfocito T; también participa en los procesos alérgicos e inflamatorios.

*Interleucina 5 (IL-5)*: Es el factor de crecimiento que estimula el crecimiento, diferenciación y activación de los eosinófilos.

*Interleucina 6 (IL-6)*: Sirve como coestimulador en el crecimiento de linfocitos y en combinación con otras citocinas en el crecimiento de las células progenitoras hematopoyéticas tempranas; también participa en los procesos inflamatorios.

*Interleucina 7 (IL-7)*: Es secretada por las células estromales y actúa sobre los progenitores hematopoyéticos comprometidos a linfocitos B; se cree que actúa al mismo nivel que IL-3 y GM-CSF.

*Interleucina 11 (IL-11)*: Es una citocina producida por las células estromales y tiene un efecto pleiotrópico sobre una gran variedad de células hematopoyéticas pero no sobre la célula seminal. Participa en forma importante en la megacariopoyesis y puede proveer buen efecto terapéutico en pacientes deficientes de plaquetas (Du y col., 1995).

*Interleucina 12 (IL-12)*: Es producida por linfocitos B, T, NK y monocitos; es el más potente estimulador de las células NK. Actúa sinérgicamente con SCF, IL-3 y otros factores de crecimiento incrementando la supervivencia y proliferación de las CSH; aumenta el número y tamaño de las colonias UFC-GEMM (Trichieri, 1995).

### **2.3.3 Factores estimuladores de colonias y otros factores**

*Factor de células seminales (SCF)*: También conocido como factor estimulador del crecimiento de mastocitos (MGF), ligando *c-kit* y *steel factor* (SF). Este factor es producido por fibroblastos, adipocitos y células endoteliales. Ejerce su acción sobre la CSH y favorece el desarrollo de mastocitos y otras células.

*Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).* Es producido por linfocitos T, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. GM-CSF participa en el crecimiento y diferenciación de todas las líneas celulares mieloides tanto en progenitores inmaduros como comprometidos, también participa en la activación de fagocitos.

*Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF).* Es producido por linfocitos T, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. G-CSF no se encuentra en torrente sanguíneo, actúa sobre los progenitores comprometidos en la vía granulocítica.

*Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF).* También conocido como CSF-1, es producido por macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. El receptor de M-CSF está relacionado con *c-kit*, y actúa sobre los progenitores comprometidos a macrófagos.

*Eritropoyetina (Epo).* Es una glicoproteína producida por las células renales; se puede encontrar en la orina y es la responsable de la estimulación y regulación de la eritropoyesis.

*Trombopoyetina (Tpo).* Se le conoce como ligando c-Mpl, es la citocina responsable de la trombopoyesis. Se ha encontrado cierta homología entre Tpo y Epo cuando sus secuencias son alineadas (De Sauvage y col., 1994).

*Ligando del receptor FLT-3 (Flt-3-L).* Se ha reportado que sinergiza fuertemente con la proteína de fusión Pixy321 (IL-3-GM-CSF) para inducir la expansión de UFC-GM y HPP. Sinergiza con Epo para inducir a UFC-GEMM (McKenna y col., 1995).

*Factor inhibidor de la leucemia (LIF).* Es una proteína que por si sola no tiene ningún efecto sobre la formación de colonias por células CD34<sup>+</sup>, se cree que juega un papel importante en la regulación de la CSH (Leary y col., 1990).

*Hormona del crecimiento (HC).* Es una proteína que está involucrada en el desarrollo del individuo y se ha demostrado que estimula la eritropoyesis *in vivo* e *in vitro* (Ardizzi y col., 1993 y Valerio y col., 1997).

#### **2.3.4 Inhibidores de la hematopoyesis**

Los inhibidores de la hematopoyesis son importantes por que participan en los mecanismos de regulación actuando como supresores. A continuación se enumeran los más comunes.

*Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ). Es producida por los linfocitos T, participa en procesos inflamatorios e inhibe la proliferación de la CSH *in vivo* e *in vitro* (Cook 1996).

*Factor transformador del crecimiento  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). Tiene efecto pleiotrópico, inhibe el crecimiento de muchas líneas celulares pero estimula el de otras. Incluso puede actuar como inhibidor o estimulador del crecimiento para una misma línea celular, dependiendo de las condiciones de cultivo y de la presencia de otros factores. TGF- $\beta$  aumenta la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, induce angiogénesis, suprime la respuesta inmune (Abbas y col., 1994) e inhibe fuertemente la proliferación de las células CD34<sup>+</sup> (Van Ranst y col., 1996).

*Factor de la necrosis tumoral  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Actúa en diferentes niveles tanto en funciones vasculares como en la respuesta inflamatoria. Causa severos trastornos en el metabolismo. En la hematopoyesis actúa suprimiendo la división de la CSH (Abbas y col., 1994).

*Interferón  $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ). Es producido por linfocitos T y células NK, participa en la activación del macrófago y células NK, actúa como inhibidor de las células CD34<sup>+</sup> (Weeks y col., 1998).

*Oxido nítrico (NO)*. Es producido por macrófagos activados y por las células estromales. El NO participa en los procesos inflamatorios, tiene acción citotóxica e induce apoptosis en los progenitores hematopoyéticos en forma directa (Maciejewski y col., 1995; Laskin y col. 1996) y mediante la señalización del receptor- FAS vía TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  (Sellery col., 1997).

La combinación y concentración de las citocinas juega un papel determinante en la inducción de la diferenciación y/o proliferación de los progenitores hematopoyéticos. Generalmente esta actividad se ve sinergizada por la presencia de otras citocinas.

Adicionalmente a las citocinas que se enumeraron anteriormente, existe un grupo de neuropéptidos -las tachicinas-, como la neurokinina A (NK-A, Rameshwar y Gascon, 1996) y la sustancia P (SP, Rameshwar y Gascon, 1997), que también participan en la modulación de la hematopoyesis.

Existen numerosos reportes acerca del efecto de combinaciones de citocinas sobre la expansión de las células hematopoyéticas. Al respecto se pueden mencionar los trabajos de Haylock y col. (1992), quienes concluyeron que la combinación de IL-1, IL-3, IL-6, SCF, G-CSF y GM-CSF, indujo una mayor expansión de UFC-GM. Para la expansión de células CD34<sup>+</sup>, se ha reportado que la combinación de IL-1, IL-3, IL-6, SCF y Epo resultó ser la más eficiente (Brugger y col., 1993; Henscheler y col., 1994). La **figura 2.2** muestra un estudio sobre el

efecto de diferentes combinaciones de citocinas sobre la expansión de UFC-GM, el cual es tomado como estandar o referencia para realizar trasplantes de médula ósea y para discutir la calidad de la expansión de células hematopoyéticas. Para este estudio, los autores utilizaron una concentración de 10 ng/mL de cada citocina, empleada sola o en combinación con otras citocinas.

En vista de que la expansión de progenitores hematopoyéticos depende de las citocinas, la concentración de estas es una variable importante para el desarrollo de los cultivos *in vitro*. Sin embargo, la información disponible es extremadamente limitada. Al respecto, Zandstra y col. (1997) reportaron que la velocidad específica de agotamiento de SCF, IL-3 y Flt-3 fue proporcional a la concentración de las citocinas en cultivos de células hematopoyéticas de médula ósea. Los autores reportaron que al aumentar la concentración de SCF de 0 a 45 ng/mL, la velocidad específica de agotamiento de SCF aumentó de 0 a 8 ng/10<sup>6</sup> cel.d. Un comportamiento similar presentaron IL-3 y Flt-3. Estas velocidades fueron obtenidas en cultivos suplementados con IL-6 y IL-11.

Dada la complejidad de los cultivos de células hematopoyéticas y a la variabilidad intrínseca de las muestras, la evaluación del efecto de la concentración de cada citocina en forma independiente o en combinación, requiere de un gran esfuerzo. Solo se ha reportado este tipo de efectos en cultivos con líneas celulares permanentes utilizadas como modelo de estudio. Por ejemplo, Zandstra y col. (1997) reportaron un comportamiento de saturación tipo Monod en cultivos de una línea celular Mo7e (línea celular humana leucémica dependiente de IL-3). Las constantes reportadas fueron una velocidad específica de desaparición de IL-3 máxima de 11.8 ± 2.8 ng/10<sup>6</sup> cel.d y una constante de saturación de 19.5 ± 1.3 ng/mL. Cabe señalar que las líneas celulares permanentes pueden tener respuestas metabólicas alteradas y el termino desaparición o agotamiento involucra la unión de las citocinas a sus receptores y la degradación por las células.

## **2.4 Aplicaciones terapéuticas de las células hematopoyéticas**

Los tejidos hematopoyéticos son sensibles a tratamientos como la quimioterapia y radioterapia, que comúnmente se utilizan en el tratamiento de algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama y de ovario. Por otra parte, existen numerosas enfermedades relacionadas con alteraciones en el sistema hematopoyético, como la anemia de Fanconi, la anemia falciforme, diversas leucemias y las talasemias, entre otras. La forma de contender con estos problemas clínicos consiste en trasplantes de células hematopoyéticas de donadores compatibles posterior a tratamientos mieloablativos (Gluckman, y col., 1989; Wagner y col., 1992; Kohli-Kumar y col., 1993).

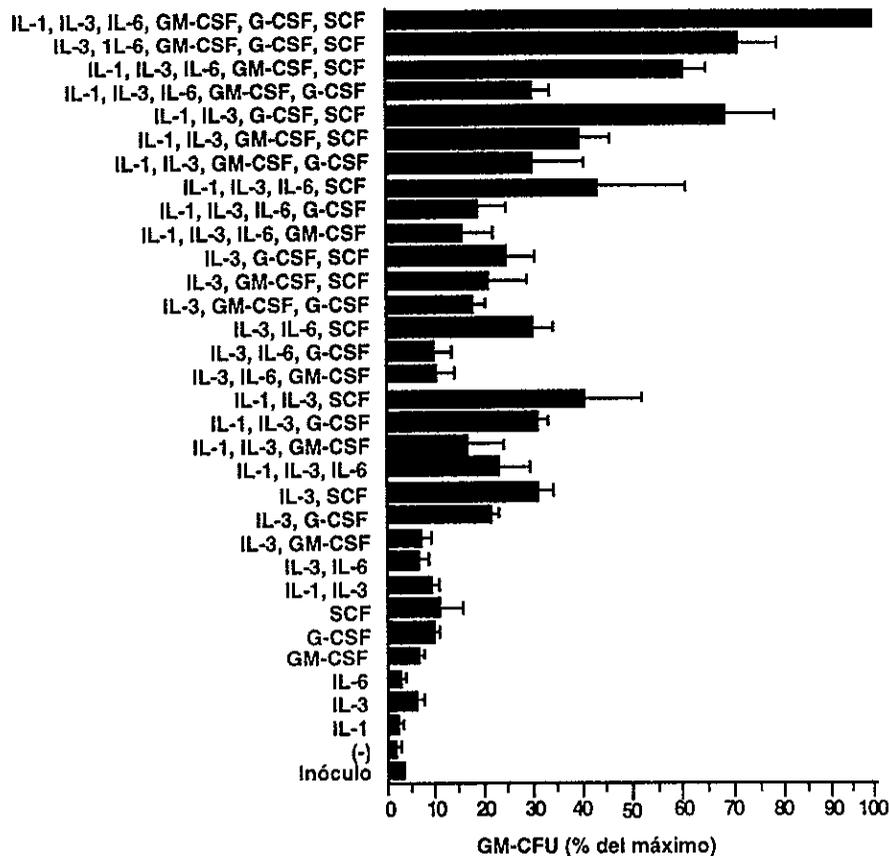


Figura 2.2 Expansión de UFC-GM utilizando diferentes combinaciones de citocinas (Haylock y col., 1992).

Adicionalmente, las células hematopoyéticas pueden ser utilizadas para la producción *in vitro* de células maduras como eritrocitos, células dendríticas (Thomas y Lipsky, 1996; Luft y col., 1998), mastocitos (Saito y col., 1996) y megacariocitos (Bertolini y col., 1997). Al respecto, Emerson (1996); McAdams y col. (1996a); To y col., (1997) han revisado y discutido en detalle las aplicaciones y los aspectos clínicos del uso de las células hematopoyéticas.

En años recientes con el desarrollado de las técnicas de biología molecular y de la terapia génica, se ha planteado utilizar a las células hematopoyéticas como vectores para introducir al organismo genes funcionales para tratar enfermedades como la inmunodeficiencia combinada congénita (Hoogerbrugge y col., 1995), la granulomatosis crónica (Hossle y col., 1995) y la adrenoleucodistrofia (Cartier y col., 1995), entre otras. Esto refleja la importancia de contar con una fuente substancial de células hematopoyéticas para ser utilizadas con fines clínicos.

## 2.5 Fuentes de células hematopoyéticas

Dado que en la edad adulta la hematopoyesis ocurre en la médula ósea, se le consideró como la primera fuente de células hematopoyéticas para uso clínico. Sin embargo, la recolección requiere de traumatismos severos y dolorosos para el donador. Una alternativa consiste en la movilización de las células hematopoyéticas de la médula ósea hacia sangre periférica, utilizando ciertos fármacos como GM-CSF, G-CSF y mediante técnicas de aféresis. No obstante, se requiere de equipo altamente especializado, haciendo esta técnica excesivamente costosa. Por otra parte, en la utilización de células hematopoyéticas de donadores adultos, la enfermedad de injerto contra hospedero (*graft versus host disease*) es frecuente y representa una de las limitaciones más serias en el uso de células hematopoyéticas provenientes de médula ósea (Nash y Storb, 1996; Sachs 1996).

Las células hematopoyéticas provenientes de tejidos fetales han sido también estudiadas. Por ejemplo, Touraine (1992), reportó el transplante de células hematopoyéticas provenientes de hígado fetal para tratar neonatos con problemas de inmunodeficiencias y talasemias. Los transplantes realizados fueron muy exitosos, demostrando la importancia de utilizar células provenientes de órganos fetales. No obstante, el uso de tejidos fetales para transplantes en adultos no ha sido muy alentador. Por ejemplo, Roy y Verfaillie (1997) demostraron que las células de hígado fetal -en particular los progenitores E-BFU- morían por apoptosis cuando se cocultivaron con células estromales de médula ósea de adultos. Al parecer esto fue originado por ciertos factores producidos por el estroma y que no eran los inhibidores convencionales (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MIP- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ ). Adicionalmente, la disponibilidad de este tipo de material biológico es muy limitado dado las características de las muestras, además de las implicaciones éticas en el uso de tejidos fetales.

Una alternativa importante a la médula ósea y los tejidos fetales consiste en la utilización de células hematopoyéticas provenientes de la sangre de cordón umbilical.

### 2.5.1 Células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical

Durante la última etapa del período prenatal, un buen número de células hematopoyéticas está presente en la sangre circulante fetal, incluyendo la sangre del cordón umbilical. En los años 70's, se presentaron las primeras evidencias de que la sangre de cordón umbilical es una fuente muy importante de células hematopoyéticas (Knudtson, 1974). Recientemente, se han incrementado los estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando las células hematopoyéticas de la sangre

de cordón umbilical (Koller y col., 1992; Mayani y Lansdorp, 1994; Piacibello y col., 1997). La conclusión obtenida fue que los progenitores presentes en tal fuente tienen un mayor potencial de proliferación que el observado en las muestras de médula ósea (Broxmeyer y col., 1989a; Broxmeyer y col. 1992; Mayani y col 1993; Lansdorp y col., 1993). La tabla 2.6 enumera las características de la sangre de cordón umbilical y de otras fuentes.

La sangre de cordón umbilical tiene muchas características favorables respecto a las otras fuentes de células hematopoyéticas. Entre las cuales se puede mencionar, el potencial proliferativo de las células embrionarias, los linfocitos no han sido del todo estimulados (la enfermedad de injerto contra hospedero es menos agresiva), las muestras son fácilmente recolectables y sin efecto adverso para el donador (Thompson 1995). Sin embargo, debido a la naturaleza de las muestras, la cantidad de células provenientes de la sangre de cordón umbilical está un orden de magnitud por debajo de los requerimientos para tratar a pacientes adultos ( $2 \times 10^9$  células). Esta limitación puede resolverse mediante la expansión *in vitro* de las células antes de ser transplantadas. En 1989, se reportó por primera vez el trasplante de la sangre de cordón umbilical a un infante con anemia de Fanconi, enfermedad potencialmente letal que se caracteriza por la incapacidad de producir células sanguíneas maduras (Gluckman, y col., 1989). Los resultados del trasplante fueron muy alentadores y en la actualidad, se han realizado alrededor de 600 trasplantes de sangre de cordón umbilical en Estados Unidos y en Europa, la gran mayoría en infantes. Estos trabajos aunados a una serie de estudios *in vitro*, han llevado a la conclusión de que la sangre de cordón umbilical es una fuente muy importante de células hematopoyéticas con utilidad clínica.

**Tabla 2.6 Características de las fuentes disponibles de células hematopoyéticas humanas.**

<b>Propiedad</b>	<b>Hígado fetal</b>	<b>Médula ósea</b>	<b>Sangre periférica</b>	<b>Cordón umbilical</b>
Concentración de células hematopoyéticas	++	++	+/-	++
Poder proliferativo	++	++	+	++
Linfocitos T no sensibilizados	+	-	-	+/-
Disponibilidad	-	+/-	+	++
Donación sin traumatismos	-	-	+/-	++
Disminución de riesgo de citomegalovirus y otros virus	+	+/-	+/-	+

## 2.6 Expansión de células hematopoyéticas

### 2.6.1 Expansión *in vitro* en cultivos estáticos

El primer intento exitoso de un sistema de cultivo que logró en forma reproducible mantener la hematopoyesis fue descrito por Dexter y col. (1977). Actualmente, distintos grupos de investigación han estudiado diferentes condiciones operacionales para realizar cultivos *in vitro* de células hematopoyéticas de médula ósea (Broxmeyer y col., 1990; Du y col., 1995), sangre periférica (Haylock y col., 1992; Brugger y col., 1993; Henschler y col., 1994) y de sangre cordón umbilical (Koller y col., 1992; Mayani y Lansdorp, 1994; Piacibello y col., 1997). Los cultivos estáticos, han sido utilizados para evaluar el efecto de diferentes combinaciones de citocinas (Haylock y col., 1992), para realizar estudios en cocultivos (Koller y col., 1995a) y para evaluar el efecto del volumen y frecuencia de recambio de medio de cultivo (Koller y col., 1995a). No obstante, estos sistemas son inherentemente de bajo volumen y presentan serias desventajas. Por ejemplo, no se pueden escalar directamente debido a que estos sistemas no son homogéneos, son difíciles de monitorear y están sujetos a manipulación intensiva que complica la operación y aumenta el riesgo de contaminación. Así mismo, dado que la transferencia de oxígeno se lleva a cabo exclusivamente por métodos difusionales, las áreas superficiales los cultivos pueden estar limitados por oxígeno (Peng y Palsson, 1996). Todo lo anterior dificulta el traslado de tales cultivos a mayores escalas, necesarias para satisfacer las demandas clínicas. Por tal motivo, en los últimos años se ha dedicado gran atención hacia el desarrollo de nuevos métodos para la expansión de células hematopoyéticas en volúmenes que se consideren clínicamente útiles.

### 2.6.2 Cultivos en biorreactor

Las nuevas opciones consisten en el diseño de reactores mediante los cuales se pretende superar las limitaciones de los cultivos estáticos. Los sistemas diseñados se pueden agrupar en: a) procesos con células inmovilizadas y b) procesos con células en suspensión.

Un sistema de perfusión fue desarrollado por Koller y col. (1993a y 1993b). El sistema consiste en unas cámaras especiales sobrelapadas (**figura 2.3**), en donde se retienen las células. Este diseño es muy versátil, ya que se pueden realizar cultivos con o sin estroma, es posible remover constantemente los desechos tóxicos como el amonio, lactato y factores inhibitorios. Sin embargo, estos cultivos tienen diversas desventajas, por ejemplo, son difíciles de muestrear, presentan costos muy elevados debido a la pérdida continua de medio de cultivo

que es subutilizado y en general, presentan gradientes de sustratos y de variables como pH, oxígeno y  $\text{CO}_2$  disueltos. Todo esto da como resultado que el microambiente celular sea poco definido.

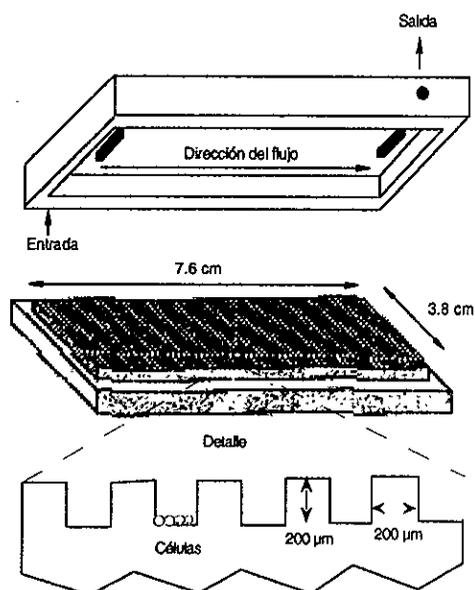


Figura 2.3 Diagrama de las cámaras utilizadas en cultivos en perfusión (Sandstrom y col., 1996).

Levee y col. (1994) reportaron un sistema de cultivo de células inmovilizadas mediante un reactor agitado en donde los progenitores hematopoyéticos provenientes de médula ósea fueron microencapsulados en forma independiente, utilizando polímeros de alginato. Tal estrategia permitió proteger a las células de posibles daños mecánicos por la agitación. En estos cultivos fue posible monitorear en forma separada la cinética de proliferación y diferenciación de cada población, lo cual no es posible con el uso de bioreactores de perfusión. Sin embargo, esta estrategia tiene el inconveniente de la heterogeneidad en la densidad poblacional entre microcápsulas, ocurren problemas de difusión y se presentan gradientes de sustratos en las mismas. Adicionalmente, al usar este tipo de cultivos, se requiere liberar a las células al final del cultivo mediante tratamientos que pueden dañar a las células.

Sardonini y Wu (1993) y posteriormente Zandstra y col. (1994) realizaron cultivos de células hematopoyéticas de médula ósea utilizando microacarreadores en biorreactores agitados. Sus resultados mostraron que no había diferencias significativas en comparación a los cultivos estáticos tomados como control. Si bien el cultivo sobre microacarreadores presentó los mismos

rendimientos celulares que el cultivo estático, el nuevo sistema presenta la ventaja de permitir cultivos de mayor volumen.

Highfill y col. (1996) cultivaron células de médula ósea murinas utilizando un reactor *airlift* donde las células se colocaron en un lecho empacado y el medio de cultivo fue continuamente recirculado. Esto con la finalidad de mimetizar el microambiente hematopoyético. Con este reactor fue posible mantener la hematopoyesis hasta por 11 semanas. Sin embargo, se requiere de un proceso adicional para recuperar las células que están adheridas a la fibra de vidrio, proceso que puede dañar a las células.

Los trabajos antes citados se realizaron con muestras de médula ósea, la cual tiene la capacidad de generar un estroma endógeno, que en cierta forma simula el microambiente hematopoyético, por lo cual muchos trabajos se realizaron utilizando células inmovilizadas (Palsson y col., 1993; Koller y col., 1993b; Sandstrom y col., 1996 y Koller y col., 1998).

Con la demostración de que el cultivo de células hematopoyéticas se puede llevar a cabo sin la presencia del estroma, mediante la adición de diferentes factores hematopoyéticos (Verfaillie, 1992), se desarrolló la investigación de cultivos en suspensión. Los sistemas agitados con células libres presentan una serie de características que los hacen muy ventajosos sobre los sistemas inmovilizados. Por ejemplo, son sistemas homogéneos, son fáciles de instrumentar, de controlar automáticamente y de escalar, además de que la toma de muestra es sencilla y representativa del cultivo. Dentro de los cultivos en suspensión se pueden mencionar los trabajos de Sardonini y Wu (1993) quienes fueron pioneros en utilizar este tipo de cultivos. Los autores utilizaron un reactor agitado y un reactor tipo *airlift*, ambos presentaron una mayor expansión que los cultivos estáticos realizados. Bathia y col. (1997) reportaron un sistema de expansión con aplicación clínica, consistente en una bolsa permeable al gas y utilizando medio condicionado por células estromales y enriquecido con IL-3. Los autores reportan que lograron una expansión de UFC y de LTC-IC de hasta 5 veces, así como la presencia de progenitores capaces de diferenciar a células NK. Kim (1998) reportó un sistema de cultivo en suspensión de células de médula ósea utilizando frascos agitados con medio condicionado por células estromales y enriquecido con factores recombinantes. El autor reporta que alcanzó una expansión de hasta 17 veces en la población de UFC-GM, equivalente a  $8.1 \pm 1.3 \times 10^6$  UFC-GM, que ya se considera aplicable a nivel clínico. Collins y col. (1998a) reportaron el cultivo de células hematopoyéticas de sangre periférica y de cordón umbilical en un biorreactor de tanque agitado bajo condiciones controladas. Los autores reportaron una expansión celular de hasta 10 veces. Sin embargo, no lograron expandir los progenitores GM, mientras que el cultivo estático presentó una expansión de hasta 4 veces de UFC-GM.

La expansión de células hematopoyéticas presenta una gran perspectiva en el campo biotecnológico ya que se ha demostrado la utilidad y seguridad de las células hematopoyéticas expandidas *in vitro*. Por ejemplo, Brugger y col. (1995), reportaron la reconstitución del sistema hematopoyético mediante trasplante autólogo de células CD34<sup>+</sup> -expandidas *in vitro*- en pacientes con cáncer de pulmón, cáncer mesofaríngeo, cáncer de mama y sarcoma de tejido blando, tratados con quimioterapia o radioterapia. Posteriormente, Bertolini y col. (1997), demostraron que los progenitores de megacariocitos expandidos *in vitro* se pueden administrar en forma segura en trasplantes autólogos en pacientes con cáncer de mama y linfoma no-Hodgkin's. Adicionalmente, los estudios con células hematopoyéticas criopreservadas que se han realizado (Nicol y col. 1995), han demostrado la utilidad e importancia de la implementación de bancos de sangre de cordón umbilical.

Hasta ahora la mayoría de los trabajos realizados, no presentan mediciones en línea y a excepción del trabajo de Collins y col. (1998a), no han sido implementados utilizando algoritmos de control de lazo cerrado, que garanticen que las variables como el pH y el OD se hayan mantenido constantes. En la actualidad la implementación de reactores monitoreados y controlados por computadora ha permitido el desarrollo y optimización de muchos procesos biotecnológicos. No obstante, tales avances no han sido explotados para el cultivo de células hematopoyéticas. A pesar de sus ventajas, los biorreactores agitados presentan aún productividades bajas. Esto se debe, entre otras causas, a la fragilidad propia de las células de mamífero (Ramírez y Mutharasan, 1992), a la limitación de algunos sustratos y/o factores hematopoyéticos y a la toxicidad de los desechos metabólicos en los cultivos celulares como lactato y amonio (Ramírez y Mutharasan, 1990; Sandstrom y col.,1994).

## Capítulo III

### Objetivos

#### Objetivo General

Diseñar y estudiar un sistema que permita la expansión de células hematopoyéticas humanas en suspensión bajo condiciones controladas de temperatura, pH y oxígeno disuelto.

#### Objetivos Específicos

Para los cultivos estáticos:

- 1.- Realizar la caracterización cinética de las células estromales de médula ósea humana.
- 2.- Evaluar la cinética de crecimiento de las células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical en cultivos por lote con y sin células estromales.
- 3.- Realizar cocultivos de células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical con células estromales operados en forma cíclica.

Para los cultivos en suspensión:

- 4.- Diseñar un biorreactor instrumentado del menor tamaño posible, donde se pueda monitorear en línea y controlar las variables más relevantes del cultivo.
- 5.- Caracterizar dinámicamente el minibiorreactor diseñado a diferentes velocidades de agitación.
- 6.- Evaluar la cinética de crecimiento y consumo de sustratos en los cultivos de células hematopoyéticas a oxígeno disuelto constante.
- 7.- Evaluar la utilidad del monitoreo en línea de la velocidad de consumo de oxígeno y del potencial redox en los cultivos de células hematopoyéticas.
- 8.- Evaluar la cinética de crecimiento de las células hematopoyéticas en frascos giratorios.

## **Capítulo IV**

### **Materiales y Métodos**

#### **4.1 Recolección de la sangre de cordón umbilical**

Las muestras de sangre de cordón umbilical fueron proporcionadas por el Hospital Regional Familiar No. 1 del IMSS-Cuernavaca. La recolecta se llevó a cabo en forma aséptica en el momento del parto utilizando tubos estériles de 50 mL, conteniendo como anticoagulante 1 mL de EDTA al 3 % esterilizado por calor. Los volúmenes de sangre colectados fueron de  $62 \pm 39$  mL (volumen promedio  $\pm$  desviación estándar).

#### **4.2 Obtención de las células mononucleares (CMN)**

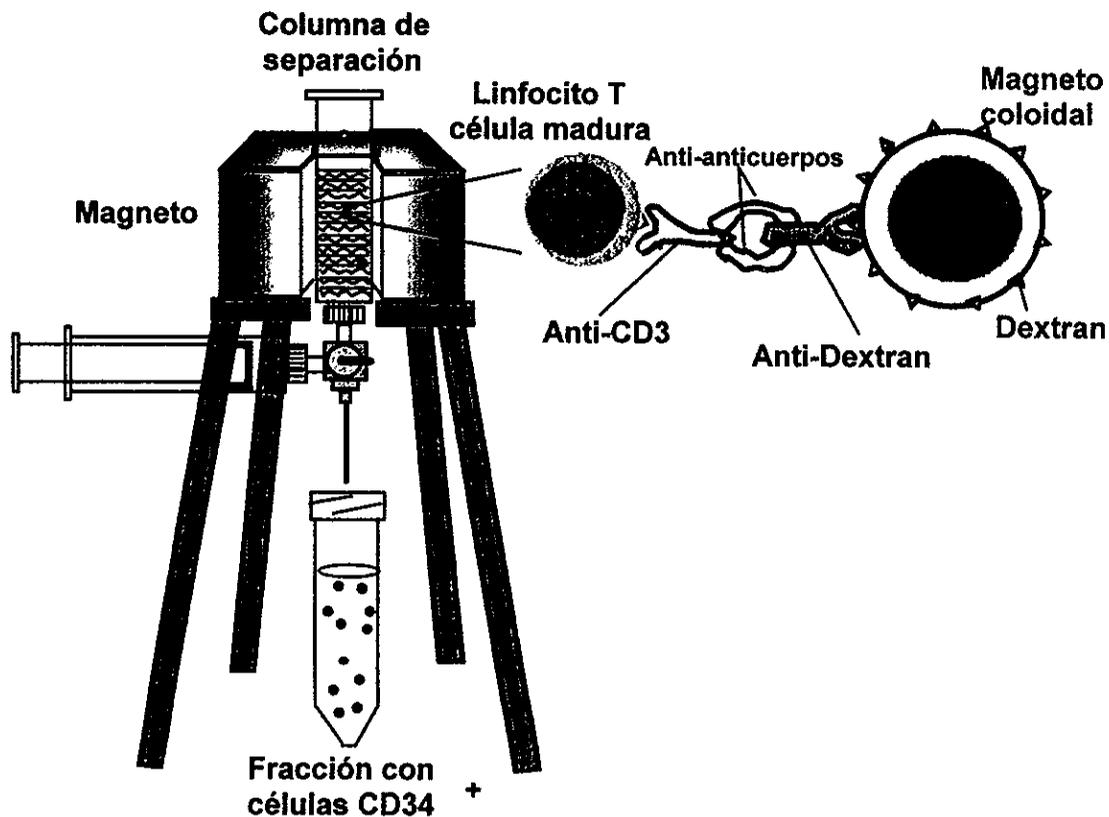
La sangre recolectada fue centrifugada a 400 g por 15 min. Posteriormente, el paquete globular blanco ubicado entre el plasma y el paquete de glóbulos rojos, fue aspirado y colocado en un tubo estéril para luego diluir 1:2 con buffer de fosfatos (PBS) pH 7.2. Esta suspensión celular se colocó en un tubo de centrifuga conteniendo previamente 7 mL del reactivo de Ficoll-Paque Plus (Pharmacia). La muestra se centrifugó a 500 g por 20 min. Nuevamente el paquete celular blanco fue colectado y resuspendido en medio IMDM al 10 % SFB (ver secc. 4.5). Tal procedimiento fue adaptado de la técnica reportada por Koller y col. (1993a).

#### **4.3 Enriquecimiento de células CD34<sup>+</sup>**

El enriquecimiento se realizó mediante una técnica de selección negativa. El método se basa en marcar y separar a las células muy diferenciadas como linfocitos, monocitos, eritroblastos, etc. (que no expresan el antígeno CD34<sup>+</sup>), mediante un conjunto de complejos tetraméricos formados por anticuerpos de ratón contra diferentes antígenos de superficie (CD2, CD3, CD14, CD19, CD24, CD56, CD66b y glicoforina A), que son marcadores de células maduras. Estos anticuerpos están unidos a anticuerpos anti-dextran, que se unen a microesferas de magneto coloidal recubiertas con dextran (**figura 4.1**).

Para la separación se procedió como se describe a continuación: se colocaron de 30 a  $80 \times 10^6$  CMN en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se adicionó 1 mL de PBS al 5 % SFB. Se le adicionó 100  $\mu$ L de la solución de anticuerpos (StemCell) y se incubó por 15 min a temperatura ambiente,

posteriormente se le adicionó 60  $\mu\text{L}$  de solución del magneto coloidal (StemCell) y se incubó nuevamente por 15 min a temperatura ambiente. Con la suspensión celular se cargó una columna de separación (StemCell) y las células  $\text{CD34}^+$  se recolectaron en un tubo de 15 mL. El sistema de separación se muestra en la **figura 4.1**. Con este sistema, el proveedor garantiza que más del 82 % de las células recolectadas son  $\text{CD34}^+$ .



**Figura 4.1.** Sistema de separación de las células  $\text{CD34}^+$  mediante selección negativo.

#### 4.4 Obtención de células estromales de médula ósea humana

La sangre de médula ósea humana fue procesada de la misma forma que la sangre de cordón umbilical, hasta obtener las células mononucleares. Con estas células, se inocularon diversas placas de 24 pozos con  $1 \times 10^6$  CMN/mL en medio IMDM (Sigma) al 10 % SFB (Gibco) y se incubaron por 7 días a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora (Precision) con atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Cada 7 días se removió completamente el medio con las células no-adherentes y se agregó medio fresco. Una vez que se observó una capa semiconfluente de células adherentes, los pozos fueron tripsinizados con solución de tripsina al 0.05% y EDTA 53 mM (Sigma). Para propagar en nuevos pozos, este paso se repitió varias veces para garantizar la eliminación de células hematopoyéticas de la médula ósea. Una vez que se llegó a confluencia,

los pozos fueron utilizados para realizar cocultivos con células mononucleares de sangre de cordón umbilical.

#### **4.5 Medios de cultivo**

Se utilizó como medio base el medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Sigma) con 10 % de suero fetal de bovino (SFB, Gibco), 0.1 mg/mL de estreptomicina, 100 U/mL penicilina y 0.25 µg/mL de amfotericina B (Sigma). El medio IMDM contiene los elementos nutricionales para el cultivo de células hematopoyéticas. Con este medio se prepararon diferentes medios enriquecidos cuya composición se muestra en la **tabla 4.1**.

El medio MethoCult GF H4434 (StemCell) contiene 0.9% metil-celulosa en IMDM, 30 % SFB, 1% albúmina de suero bovino,  $10^{-4}$  M de 2-mercapto-etanol, 2 mM glutamina, 50 ng/mL de SCF, 10 ng/mL de GM-CSF, 10 ng/mL de IL-3 y 3 U/mL de Epo.

La combinación de citocinas se eligió en base a los datos de la literatura y la concentración se definió en forma subjetiva debido a los costos de las citocinas, y solo se consideró como un modelo de estudio.

El estudio reológico de los medios de cultivo se realizó con un reómetro Contraves Rheomat 120 (Contraves, Zurich) y con un dispositivo de cilindros concéntricos (MS-0/115) para fluidos de baja viscosidad.

#### **4.6 Cultivos estáticos**

Los cultivos se realizaron en placas de 24 pozos (Costar) utilizando 1 mL de medio de cultivo e inoculando  $0.5 \times 10^6$  cel/mL. Las placas se colocaron en un incubadora (Precision) a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.

#### **4.7 Cocultivos estáticos cíclicos**

Los cocultivos se realizaron en placas de 24 pozos (Costar) conteniendo previamente una capa confluyente de células estromales (obtenidas según lo descrito en la sección 4.4) y conteniendo 1 mL de medio de cultivo IMDM-MTC. Posteriormente se inocularon células mononucleares de sangre de cordón umbilical a una densidad de  $0.5 \times 10^6$  cel/mL. Las placas se colocaron en un incubadora (Precision) a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. En el primer recambio todas las células fueron reagreas al cultivo y en los siguientes ciclos, se regresó una concentración celular

similar al inóculo. Solo fue posible realizar tres ciclos de cultivo debido al daño en la capa estromal ocasionado por la intensa manipulación.

**Tabla 4.1. Composición de los medios enriquecidos.**

Medio	Porcentaje de medio base	Porcentaje de medio rico
IMDM-MTC	90 %	10 % MethoCult GF H4434 (StemCell)
IMDM-MCF	50 %	50 % Medio IMDM metabolizado por células estromales
IMDM-Cit	más de 99%	Diferentes citocinas (ver tabla 4.2).

**Tabla 4.2. Citocinas utilizadas para el medio IMDM-Cit.**

Citocina	Marca	Concentración
IL-6	Promega	8 ng/mL
IL-3	Promega	3 ng/mL
SCF	Peptotech	3 ng/mL
GM-CSF	Probiomed	10 ng/mL
Epo	Cilag	3 U/mL

#### 4.8 Construcción del sistema de cultivo en biorreactor

El sistema de cultivo está constituido por un biorreactor de 500 mL con soporte (Omniculture), mediante el cual fue posible manipular la velocidad de agitación y controlar la temperatura del medio de cultivo. El biorreactor fue equipado con un impulsor de barra ( $Di/D=0.57$ ) y la transferencia de oxígeno fue mediante aireación superficial. Las corrientes de los gases, tanto a la entrada como a la salida del fermentador, fueron filtradas a través de membranas (Millipore) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro.

El oxígeno disuelto se midió con un electrodo polarográfico (Ingold), el pH a través de electrodos de vidrio (Ingold) y el potencial redox con un electrodo de platino (Ingold), todos esterilizables. El oxígeno disuelto en todos los casos se reportó como porcentaje de saturación con respecto al aire en agua a 37 °C y aproximadamente 0.85 atm. de presión. La señal de los electrodos se amplificó en el intervalo de 0 a 5 VCC (amplificadores Ingold) y se adquirió en una computadora Macintosh II SI a través de los convertidores análogos/digitales (A/D) de una

tarjeta de interfase 411 (GW Instruments). A través de un algoritmo de control, descrito en detalle más adelante, las señales adquiridas se almacenan en disco duro y se despliegan en línea sobre la pantalla de la computadora, tanto en forma gráfica como en forma numérica. Los valores así adquiridos son procesados y las variables secundarias son calculadas, mediante las cuales se toma la acción de control para mantener el oxígeno disuelto y el pH en el valor deseado. Tal acción de control se toma mediante señales analógicas enviadas por la tarjeta de interfase a través de los convertidores digitales/analógicos (D/A) a tres controladores de flujo másico (Brooks): para nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono con de una capacidad de 1,000 mL/min (0 a 5 VCC).

El componente central para el funcionamiento del simulador es el programa de control, escrito en Microsoft QuickBasic<sup>®</sup>. La primera parte del programa, consiste en la introducción de los datos de fermentación y control, proporcionados por el usuario, y en la inicialización de parámetros necesarios (cronómetros y contadores para el tiempo de control y el tiempo de adquisición de datos). Enseguida se llevan a cabo el resto de las sub-rutinas, cada una con una función determinada: controlar, leer, desplegar o almacenar datos.

La sub-rutina de control de TOD se basa en un algoritmo retroalimentado proporcional-integral-derivativo (PID) y para el pH se utilizó una sub-rutina de control proporcional (P) que permitió manipular la presión parcial de CO<sub>2</sub> a la entrada del bioreactor (el control del pH se realizó exclusivamente manipulando la presión parcial de CO<sub>2</sub>). En la computadora se compara el valor de oxígeno disuelto y pH deseados (*setpoints* o puntos de control) con la lectura proporcionada por el sensor (elemento de medición). De acuerdo a esta diferencia o "error" se establece la acción de control sobre el proceso. De esta manera los controladores de flujo másico actúan aumentando o disminuyendo los flujos individuales de oxígeno, CO<sub>2</sub> y de nitrógeno (variables manipuladas), para cambiar la composición del gas de alimentación, pero manteniendo el flujo total constante. El programa utiliza la forma discreta del control PID dada por la ecuación 4-1 y el control P por la ecuación 4-2.

$$O_2 \% = O_2 \%_{n-1} + Kc \left[ \left( 1 + \frac{\phi}{\tau_i} + \frac{\tau_d}{\phi} \right) E_n - \left( 1 + \frac{2\tau_d}{\phi} \right) E_{n-1} + \left( \frac{\tau_d}{\phi} \right) E_{n-2} \right] \quad (4-1)$$

$$CO_2 \% = CO_2 \% + Kc_2 E \quad (4-2)$$

donde:

$O_2 \%$  = % flujo de oxígeno actual  
 $O_2 \%_{n-1}$  = % flujo de oxígeno anterior

$\text{CO}_2\%$	= % flujo de $\text{CO}_2$
$\phi$	= tiempo de control
$K_c$	= constante proporcional para oxígeno disuelto
$K_{c2}$	= constante proporcional para pH
$\tau_i$	= constante integral para oxígeno disuelto
$\tau_d$	= constante derivativa para oxígeno disuelto
$E$	= error para pH
$E_n$	= error actual para oxígeno disuelto
$E_{n-1}$	= error anterior para oxígeno disuelto
$E_{n-2}$	= error anterior a dos tiempos para oxígeno disuelto

Las constantes de control ( $K_c$ ,  $K_{c2}$ ,  $\tau_i$ ,  $\tau_d$ ), se determinaron a través de métodos de afinación convencionales y se fijaron al inicio de los experimentos. Cuando era necesario, se modificaban en línea durante el transcurso del experimento (Court 1988; De León 1996).

#### 4.9 Caracterización del minibiorreactor

El tiempo de mezclado del minirreactor se determinó a través de la curva de respuesta del pH ante pulsos de ácido. Para ello, se añadió 0.2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y la curva de respuesta se determinó utilizando un electrodo de pH (Ingold) con un tiempo de respuesta de 20 s. El tiempo de mezclado ( $t_m$ ) se definió como el tiempo necesario para alcanzar el 95% de homogeneidad en el seno del líquido del reactor, ante una perturbación en el pH. El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_La$ ), la velocidad máxima de respuesta (VRS) y el tiempo muerto del sistema ( $t_d$ ), se determinaron mediante la curva de respuesta del sistema ante una perturbación tipo cambio escalón en el flujo de oxígeno a la entrada del reactor (De León y col. 1995). La caracterización se realizó en medio libre de células a velocidades de agitación entre 0 y 150 rpm.

#### 4.10 Cultivos en biorreactor

Los cultivos se llevaron a cabo en un volumen de trabajo de 120 mL a 75 rpm mediante agitación magnética con una base Omniculture. La temperatura se controló a  $37^\circ\text{C}$  mediante una chaqueta de recirculación de agua. El oxígeno disuelto (OD) se midió con un electrodo polarográfico (Ingold) y se reportó en porcentaje respecto a la saturación con aire. El OD se controló a un valor determinado utilizando el sistema descrito previamente. El pH se midió con un electrodo de vidrio (Ingold) y se controló a 7.2. El potencial redox del cultivo se midió con un electrodo de platino (Ingold).

## **4.11 Cultivos en frascos giratorios**

Se utilizaron frascos giratorios de vidrio (Wheaton) de 675 cm<sup>2</sup> de área interna, conteniendo 100 mL de medio de cultivo IMDM-MTC a pH 7.4, atmósfera inicial de 5 % de CO<sub>2</sub> y cerrados herméticamente. Diariamente los cultivos fueron colocados una hora en una incubadora (Precision) a 37°C y con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los frascos fueron colocados en incubación a 37°C y en rotación a 1.2 rpm. El inóculo fue de 0.5 x 10<sup>6</sup> cel/mL.

## **4.12 Métodos analíticos**

### **4.12.1 Concentración celular**

La concentración celular y la viabilidad se determinaron mediante la exclusión del azul de tripano (Sigma). La concentración de células mononucleares se determinó mediante el reactivo de turk (solución de ácido acético al 3%), el cual tiene la propiedad de lisar a los eritrocitos, mientras que los leucocitos son resistentes a la solución. En ambos casos las cuentas se realizaron utilizando un hematocitómetro.

Para despegar las células adherentes, se procedió como sigue: se eliminó el medio metabolizado de las placas, posteriormente se le adicionó 0.2 mL de solución de tripsina-EDTA (Gibco) a cada pozo y se incubó la placa a 37°C por 10 min. Después se adicionó 100 µL de SFB(Gibco) y se procedió a la cuenta con azul de tripano (Sigma).

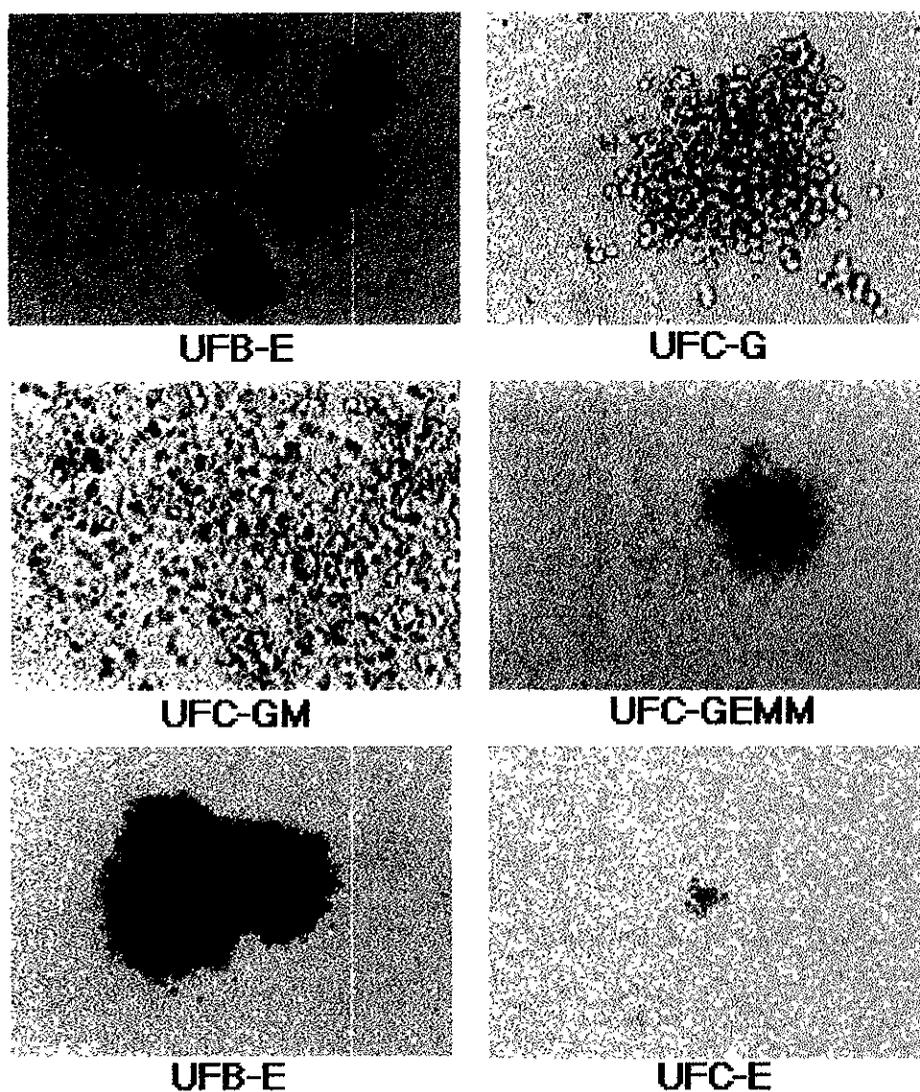
### **4.12.2 Concentración de metabolitos**

La glucosa, lactato, glutamina y glutamato se determinaron en un analizador enzimático YSI 2700 (Yellow Spring Co.). Los aminoácidos se determinaron mediante cromatografía de líquidos utilizando un analizador automático (Beckman), cuya técnica ha sido descrita previamente por Palomares (1996).

El amonio se midió utilizando el método del indofenol o método de Kaplan. El método consiste en transformar el amonio a cloramina mediante la acción del hipoclorito. Posteriormente, la cloramina reacciona con el fenol originando el cromógeno p-hidroxifenil imino benzoquinona. La técnica consiste en colocar 25 µL de muestra en un tubo con rosca, se agrega 1 mL del reactivo A (fenol 0.106M, nitroprusiato de sodio 0.17 mM), se agita vigorosamente y se agrega 1 mL del reactivo B (NaOH 0.125N, NaOCl 11 mM). Posteriormente se reposa 30 min y se determina la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman) a 635 nm.

### 4.12.3 Ensayos clonogénicos

El principio de los ensayos clonogénicos se describe en la sección 2.2.4. y se realizó como se describe a continuación. Se inocularon de 10 000 a 40 000 células en 1 mL de medio semisólido MethoCult GF H4434 (StemCell Technologies). La suspensión celular fue transferida a una caja petri de 35 mm (Costar). Las placas fueron incubadas por 14 días a 37°C en una incubadora (Precision) con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las colonias contabilizadas se denominaron como unidades formadoras de colonias de eritroides (UFC-E), colonias *burst* de eritroides (UFB-E), de granulocitos (UFC-G), de macrófagos (UFC-M), de granulocitos y macrófagos (UFC-GM) o multipotentes (UFC-GEMM). Algunos progenitores obtenidos se muestran en la **figura 4.2**.



**Figura 4.2. Progenitores hematopoyéticos obtenidos mediante el ensayo clonogénico.**

#### 4.12.4 Determinación de citocinas

La medición se basa en inmuno ensayos utilizando anticuerpos monoclonales de ratón contra IL-6 de humano que reconocen específicamente a la IL-6 de los medios de cultivo. Posteriormente se utiliza una solución de anticuerpos policlonales de conejo contra IL-6 humana, estos anticuerpos están conjugados con peroxidasa de rábano. El ensayo enzimático se realizó utilizando como sustrato tetrametilbenzidina en solución con peróxido de hidrógeno. El color obtenido es proporcional a la concentración de IL-6 en el medio de cultivo.

La determinación de la concentración de las citocinas IL-6 y GM-CSF se realizó utilizando *kits* comerciales (R & D Systems) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las placas fueron leídas en un lector de ELISA EL<sub>x</sub> 800 (Biotek Instruments).

### 4.13 Definiciones

La expansión celular se definió como la relación entre la concentración celular a un tiempo dado ( $X_t$ ) y la concentración celular en el inóculo de ese cultivo ( $X_0$ ).

$$\text{Expansión} = \frac{X_t}{X_0} \quad (4-3)$$

De igual forma, la expansión de progenitores se definió como la relación entre la concentración de progenitores a un tiempo dado ( $\text{UFC}_t$ ) y la concentración de progenitores en el inóculo de ese cultivo ( $\text{UFC}_0$ ).

$$\text{Expansión} = \frac{\text{UFC}_t}{\text{UFC}_0} \quad (4-4)$$

Los coeficientes metabólicos,  $q_i$ , se obtuvieron de la ecuación siguiente.

$$\frac{dS_i}{dt} = q_i X \quad (4-5)$$

donde  $S_i$  es la concentración de sustrato "i", que puede ser glucosa, lactato, GM-CSF, IL-6 o amonio;  $q_i$  es el coeficiente metabólico (consumo específico del sustrato "i", o producción específica del producto "i"). Los coeficientes fueron obtenidos en la fase de crecimiento exponencial, donde los coeficientes metabólicos son constantes.

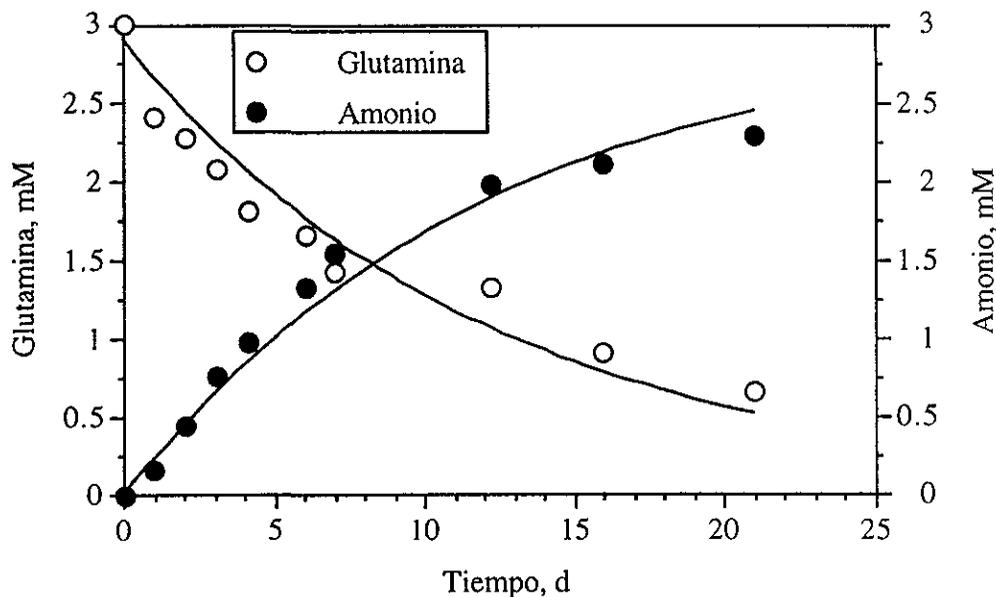
## Capítulo V

### Resultados y Discusión

#### 5.1 Caracterización del medio de cultivo

El Medio IMDM es un medio rico capaz de satisfacer las demandas de las células progenitoras, uno de los sustratos más importantes es la glutamina, utilizada como fuente de nitrógeno. Sin embargo, es un aminoácido -entre otros- que sufre descomposición espontánea siguiendo una cinética de primer orden. La **figura 5.1** muestra el perfil cinético de la desaparición de la Gln y la generación de amonio como producto de la reacción, este último comúnmente se le refiere como un metabolito tóxico para las células animales. La constante cinética de degradación a 37°C y pH 7.2 fue de  $3.4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , que es mayor a la reportada por Ozturk y Palsson (1990) para medio DMEM ( $2.17 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). Se observa que se alcanzó una concentración de amonio de más de 2 mM que ya se considera tóxico para algunas líneas celulares, sin embargo, esta concentración parece ser inocua para las células hematopoyéticas (López-Chalini y col. 1998). La aparición de amonio puede ser estimada con la ecuación (5-1).

$$[\text{NH}_4^+] = [\text{Gln}]_0 (1 - e^{-kt}) \quad (5-1)$$



**Figura 5.1.** Descomposición espontánea de la glutamina y generación de amonio en medio IMDM al 10 % SFB y libre de células. Los puntos son los datos experimentales y las líneas corresponden al modelo cinético de descomposición de primer orden con una constante de  $3.4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ . La concentración de amonio viene dada por la ec. 5-1.

El medio de cultivo IMDM-cit se utilizó en este trabajo para cultivos en donde las células se encuentran libres o adheridas a una capa estromal en el caso de los cocultivos. No obstante, se ha utilizado en cultivos de células hematopoyéticas sobre microacarreadores (Sardonini y Wu, 1993; Zandstra y col., 1994), sin tener mejoras en la expansión celular. A continuación se discute un sencillo estudio reológico de los medios de cultivo y se discute la importancia de la viscosidad de los medios de cultivo y su efecto sobre el crecimiento celular.

En la figura 5.2 se muestran los reogramas de los medios de cultivo a 37°C, se observa que el medio IMDM al 10% SFB equivalente al medio IMDM-cit presentó un comportamiento de fluido newtoniano con una viscosidad de 0.6 mPa.s igual que el agua. Por el contrario, el medio IMDM-MTC que contiene 0.09% de metilcelulosa, presentó un comportamiento pseudoplástico al igual que el suero fetal de bovino. A gradientes de deformación superiores a 500 s<sup>-1</sup> la viscosidad permaneció constante a 1.2 mPa.s, que representa el doble de la viscosidad del medio IMDM-SFB.

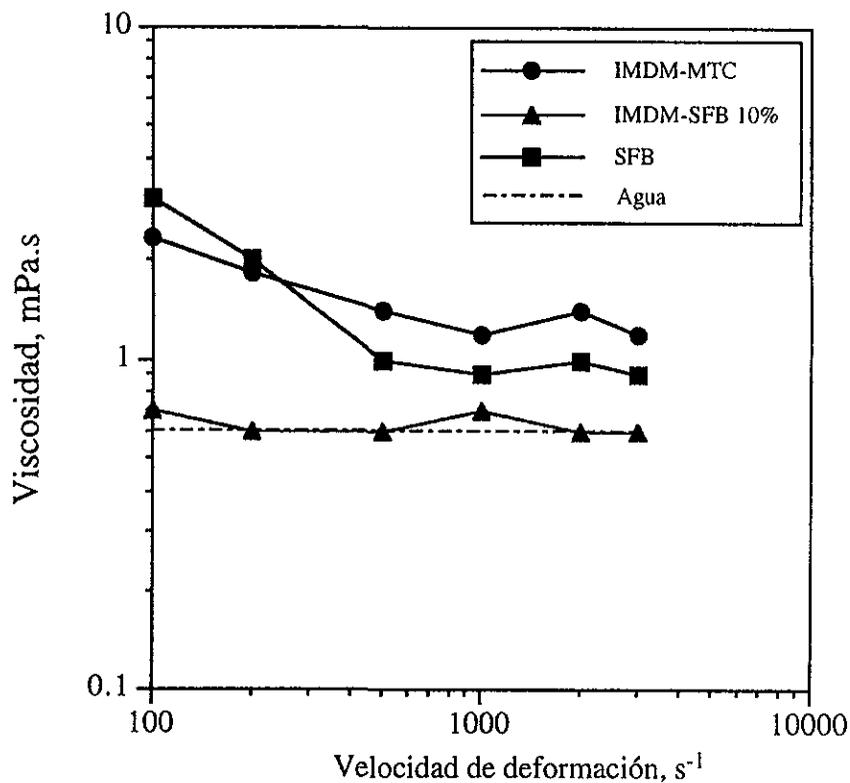


Figura 5.2. Reograma de los medios de cultivo utilizados. El medio IMDM-10%SFB es un fluido newtoniano, mientras que el SFB y el IMDM-MTC (contiene 0.09% de metilcelulosa) presentaron comportamiento pseudoplástico.

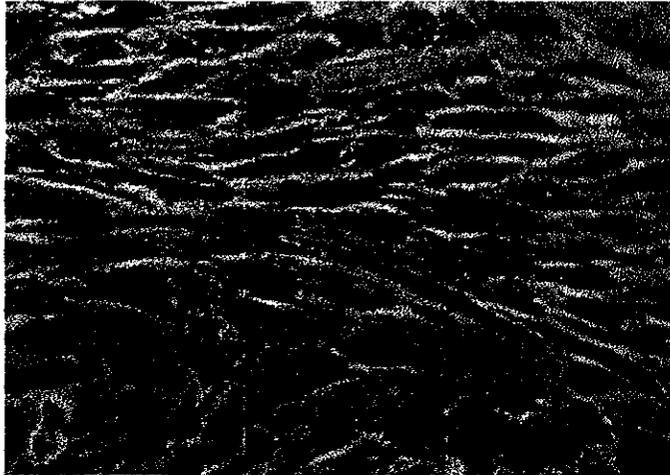
Se ha demostrado en base a la teoría de Kolmogorov que al aumentar la viscosidad, se incrementa el tamaño de los torbellinos terminales (*eddy terminal*), se reduce la velocidad y la concentración de los torbellinos, dando como resultado un aumento importante en la velocidad específica de crecimiento de los cultivos con microacarreadores (Croughan y col. 1989; Lakhotia y Papoutsakis 1992). Dado que el medio IMDM-MTC presenta la ventaja de que reológicamente se parece más al suero y al presentar mayor viscosidad que el medio IMDM-SFB puede aportar protección adicional a las células contra el estrés mecánico para cultivos de células hematopoyéticas sobre microacarreadores, no obstante, esto debe ser probado.

## 5.2 Cinética de células estromales de médula ósea humana

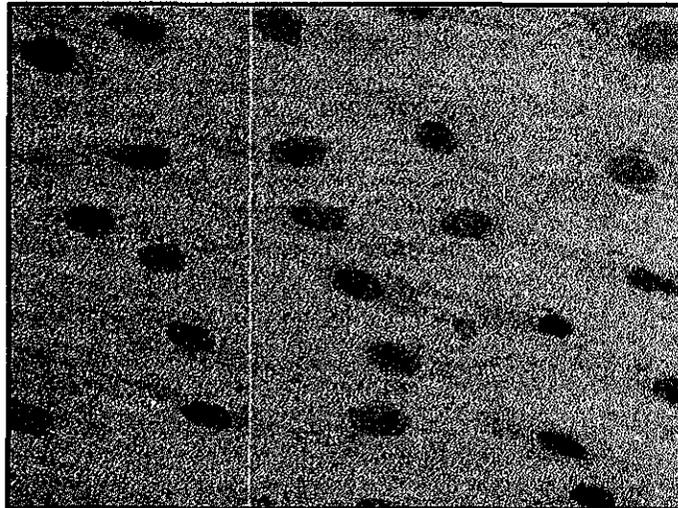
Dado que *in vivo* la hematopoyesis ocurre dentro del microambiente hematopoyético, condición que se desea simular mediante cocultivos de células hematopoyéticas y células estromales, fue necesario conocer primeramente los requerimientos metabólicos y el comportamiento cinético de las células estromales. Para ello, se evaluó el crecimiento de las células estromales de médula ósea humana. En la **figura 5.3** se muestra un cultivo de células estromales sin teñir y la **figura 5.4** una tinción de Wright de un cultivo en confluencia (proporcionada por el Dr. Mayani). Se observa que las células presentan formas alargadas que es característico de los fibroblastos. Es notorio que las células tienden a orientarse hasta formar una monocapa. Este comportamiento se ha observado en líneas celulares adherentes como los fibroblastos 3T3 (Furitsu y col. 1989). La **figura 5.5** muestra una cinética de crecimiento, generación de lactato, consumo de glucosa y de amonio para fibroblastos de médula ósea. Se observa que se alcanzó una concentración celular de  $3.1 \times 10^4$  cel/mL al tercer día de cultivo, donde el área fue el factor limitante del crecimiento, sin embargo, fue posible mantener el cultivo confluyente hasta 3 semanas. La velocidad específica de crecimiento y la velocidad específica de consumo de glucosa fueron de  $0.013 \text{ h}^{-1}$  y  $18 \times 10^{-10} \text{ mmol/cel.h}$ , respectivamente.

En la **figura 5.5b** se observa que el amonio, un metabolito reportado como tóxico para algunas líneas celulares, es consumido por las células estromales a una velocidad específica aparente de  $1.19 \times 10^{-10} \text{ mmol/cel.h}$ . Probablemente el amonio es utilizado en la síntesis de algunos componentes nitrogenados de la matriz extracelular como los glucosaminoglicanos y en la síntesis de alanina. Se ha reportado que la adición de amonio al medio de cultivo libre de suero estimula la producción de enzimas extracelulares como la pro-colagenasa en los fibroblastos, por lo cual es considerado como un sustrato que debe agregarse al medio de cultivo (Sando y Rosenbaum, 1985). La capacidad de consumir amonio por las células estromales resulta importante ya que puede ser de utilidad al momento de realizar cocultivos y disminuir la posible toxicidad del amonio reportada para las células hematopoyéticas por Kimura y col., (1987). En

encontró que la velocidad específica de consumo de amonio por las células estromales fue de 6.83 y de  $2.3 \times 10^{-10}$  mmol/cel.h para la fase exponencial y estacionaria, respectivamente. En cuanto al consumo de glucosa, se observa que en la fase estacionaria la glucosa fue trasformada en lactato, como lo demuestran las **figuras 5.5b** y **5.7**. El rendimiento molar de lactato en base a glucosa fue de 1.97, lo que puede indicar una alta actividad glicolítica y posiblemente una limitación de oxígeno en el cultivo.

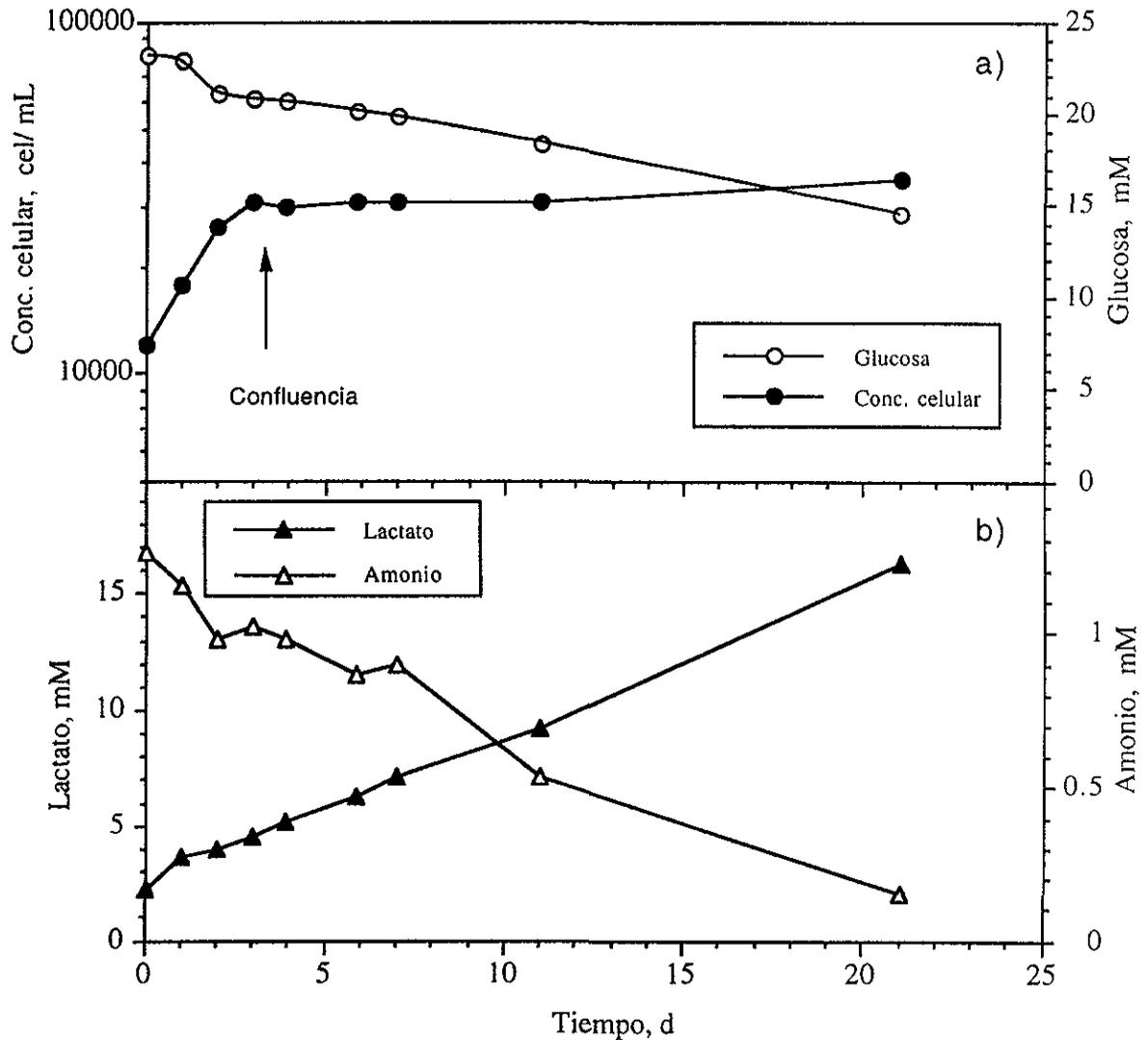


**Figura 5.3.** Cultivo de células estromales de médula ósea humana (40x). Las células presentan formas alargadas típicas de los fibroblastos.

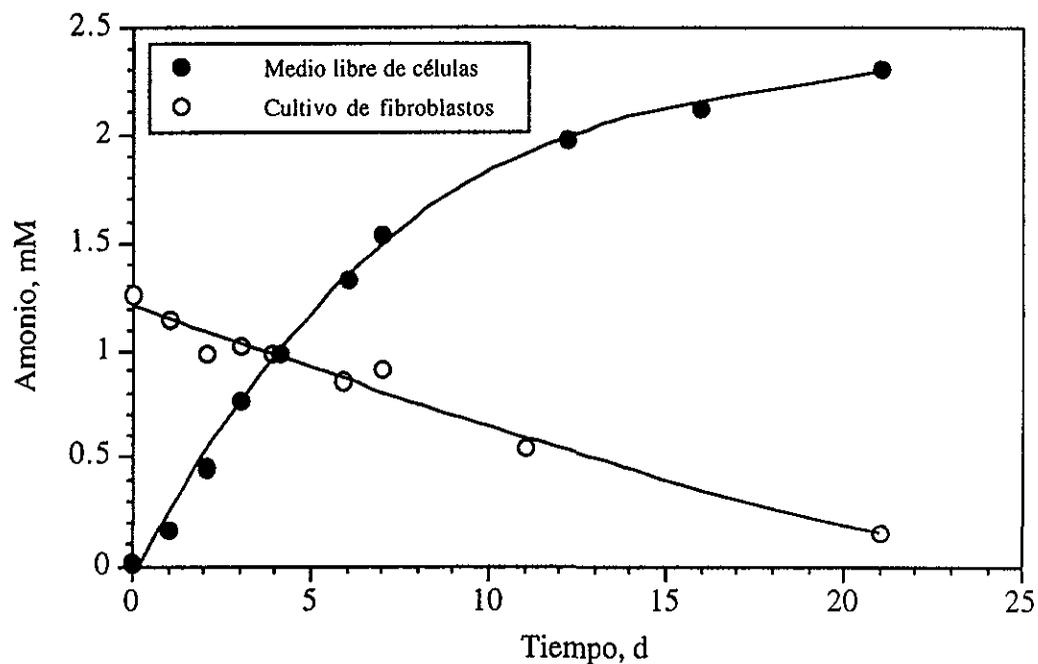


**Figura 5.4.** Cultivo confluyente de células estromales de médula ósea con tinción de Wright (100x). (fotografía proporcionada por el Dr. H. Mayani). Las células se encuentran alineadas y empacadas formando una monocapa.

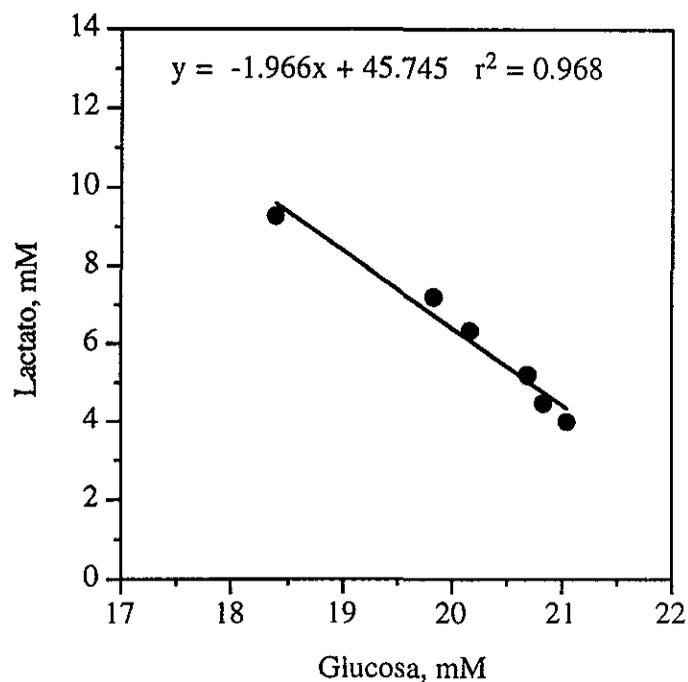
La **figura 5.8** muestra el perfil de los aminoácidos en el cultivo. Los aminoácidos fueron clasificados en base a la importancia de su consumo o producción, según el caso. Los resultados muestran que el consumo de Glu, Thr, Met, Lys, Hys, Arg, Pro, Val, Leu, Ile, Tyr, Phe y Trp fue despreciable. Por el contrario el consumo de Asp, Asn Gln, Cys y Ser fue muy importante, siendo la serina el único aminoácido que se agotó. Mientras que la Ala y Gly fueron producidos en la fase estacionaria.



**Figura 5.5. Cinética de crecimiento de células estromales de médula ósea.** El cultivo alcanzó la fase estacionaria en el día 3. Se resalta la capacidad de los fibroblastos de consumir amonio. Se utilizó medio base (IMDM 10 % SFB).



**Figura 5.6. Comparación de la cinética de amonio en medio IMDM libre de células y en un cultivo de células estromales.** La velocidad específica aparente de consumo de amonio fue de  $1.19 \times 10^{-10}$  mmol/cel.h y la velocidad específica real fue de  $6.83 \times 10^{-10}$  mmol/cel.h. Se utilizó medio base (IMDM 10 % SFB).



**Figura 5.7. Rendimiento de lactato en el cultivo de células estromales..**

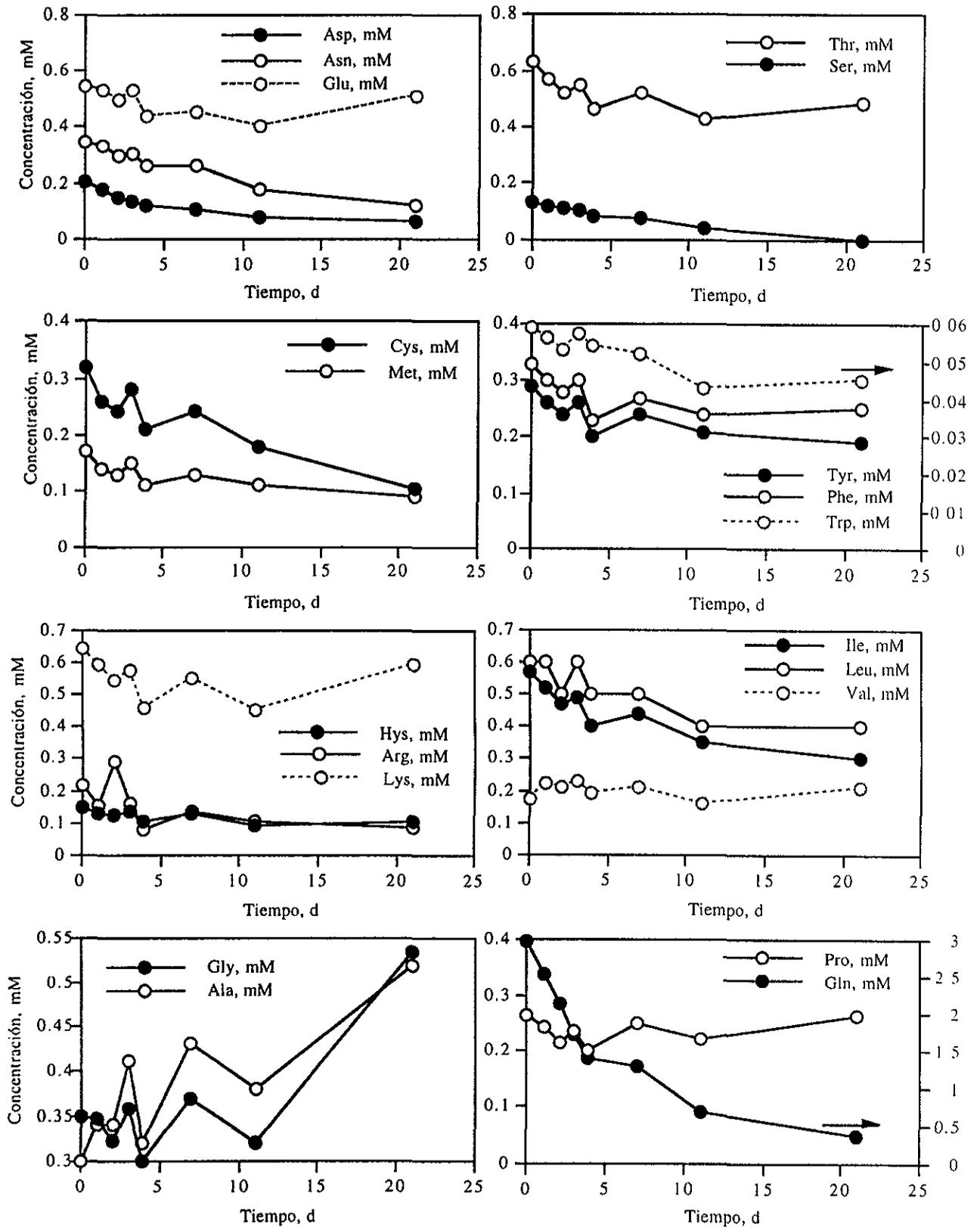
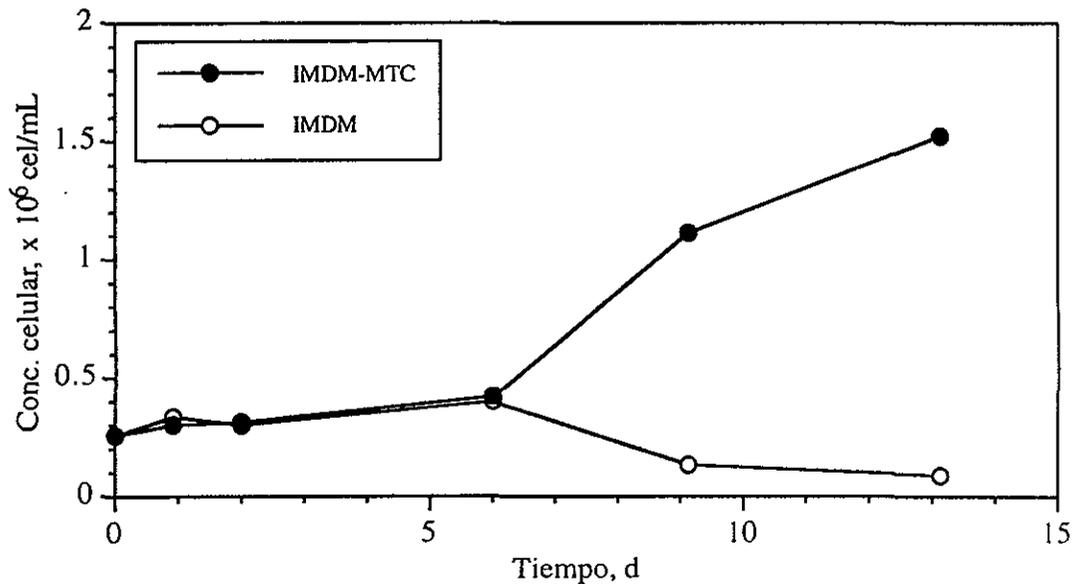


Figura 5.8. Cinética de consumo y producción de aminoácidos en el cultivo de células estromales.

### 5.3 Cultivos estáticos de células hematopoyéticas con y sin citocinas

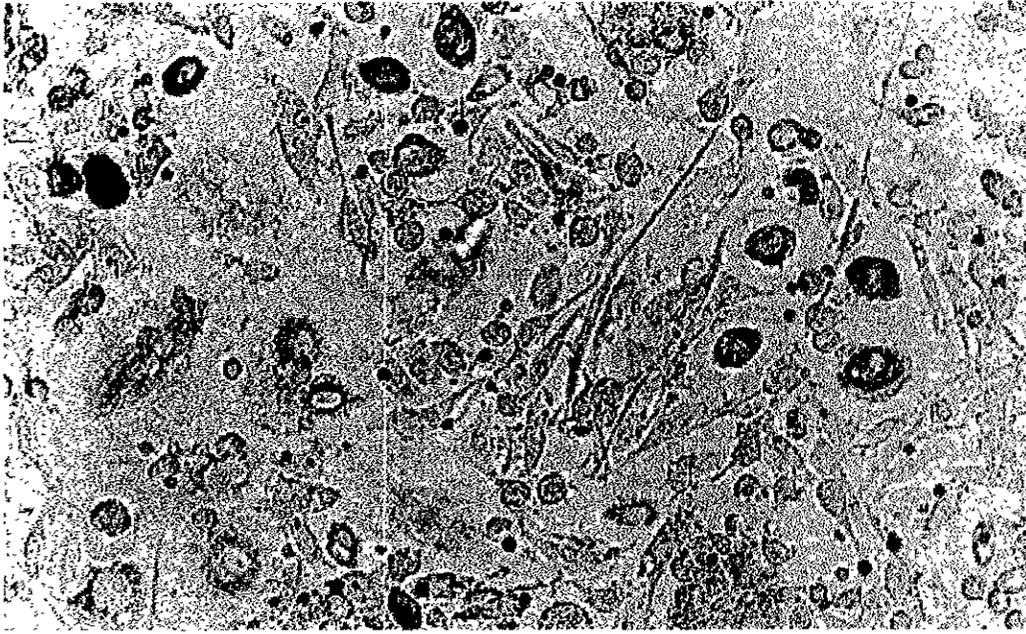
La **figura 5.9** muestra las cinéticas de crecimiento de las células hematopoyéticas con y sin citocinas. Se observa que en presencia de factores de crecimiento, la concentración celular aumentó de  $0.25 \times 10^6$  hasta  $1.5 \times 10^6$  cel/ml, con una velocidad específica de crecimiento de  $0.14 \text{ d}^{-1}$ . Valor que compara con la  $\mu$  de  $0.15 \text{ d}^{-1}$ , obtenida de los datos de Zandstra y col. (1994). Mientras que el cultivo sin factores solo aumentó de  $0.25 \times 10^6$  a  $0.4 \times 10^6$  cel/mL y después entró en fase de muerte. Las **figuras 5.10** y **5.11** corresponden a las fotografías tomadas en el día 6 en los cultivos con y sin citocinas, respectivamente. Se observa que en ausencia de los factores de crecimiento, las células predominantes son fusiformes (en forma de huso) probablemente macrófagos y monocitos, además de otras especies celulares no identificadas. Por el contrario, en el cultivo con citocinas, la expansión celular se favorece y el número de células adherentes como monocitos y macrófagos es reducido.



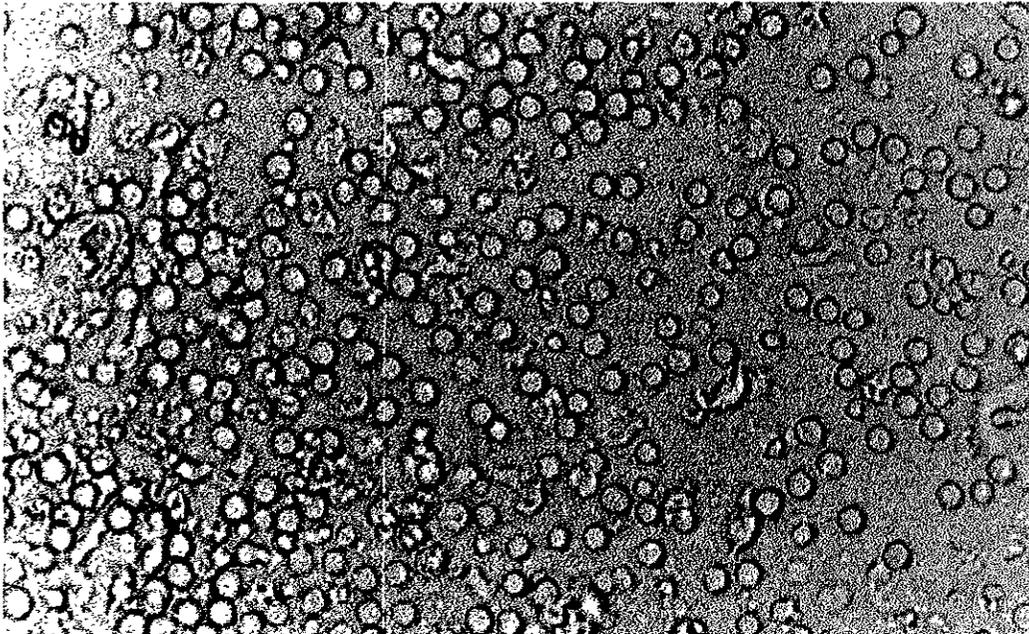
**Figura 5.9.** Cultivos de células hematopoyéticas con y sin citocinas. La falta de citocinas impidió la expansión celular.

### 5.4 Cinética de células hematopoyéticas y estromales en cocultivos estáticos por lote

Primeramente se realizaron cocultivos de células hematopoyéticas y células estromales utilizando medio IMDM. En todos los casos las células hematopoyéticas murieron de igual forma que los cultivos sin factores descritos anteriormente.



**Figura 5.10. Cultivo de células hematopoyéticas en medio sin citocinas (40x).** Se observa que predominan las células fusiformes probablemente monocitos y macrófagos. Se utilizó medio base (IMDM 10 % SFB).



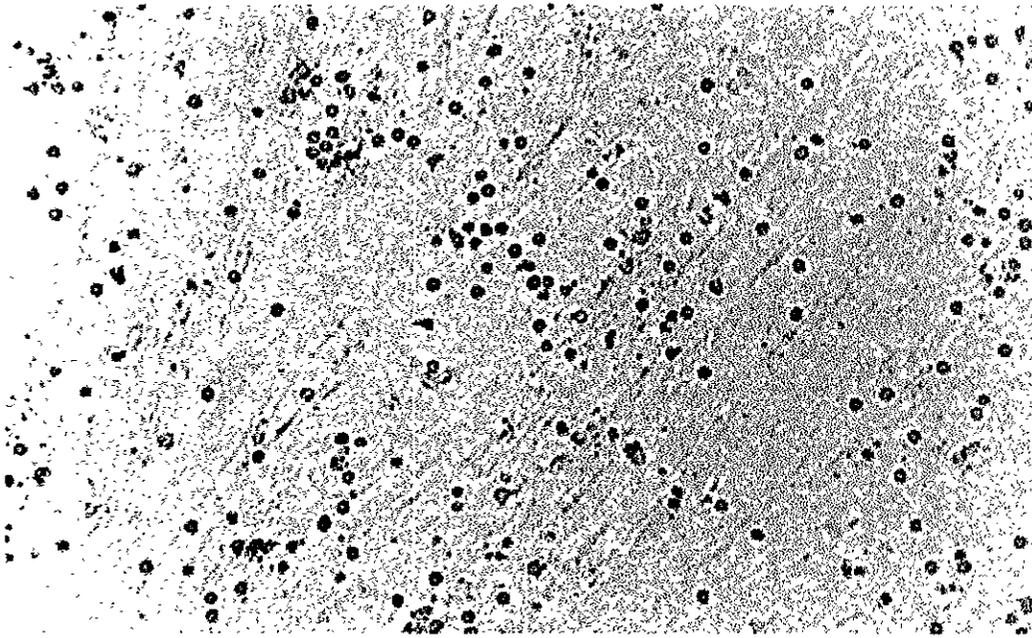
**Figura 5.11. Cultivo de células hematopoyéticas en medio con citocinas (40x).** La expansión celular se favorece y el número de células adherentes es muy reducido. Se utilizó medio IMDM-MTC.

La **figura 5.12** muestra una fotografía de los cocultivos a tiempo 0, se aprecia el estroma confluyente en la parte posterior y encima las células hematopoyéticas. En la **figura 5.13** se muestran los resultados de las cinéticas de expansión de células hematopoyéticas con estromas de placenta (hF-Pla)<sup>1</sup>, de fibroblastos murinos 3T3 (mF-3T3)<sup>1</sup> y de médula ósea de pacientes con linfoma (hF-Lin). En la **figura 5.13a** se muestra la cinética de crecimiento de la células en suspensión, se observa que la velocidad específica de crecimiento fue muy similar entre ellas ( $0.24 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$ ). Sin embargo, el cocultivo con estroma de linfoma hF-Lin presentó una mayor fase lag. Se observa que el cultivo sin estroma, presentó una ligera disminución en la concentración celular después del día 15. Respecto a la concentración celular, el cultivo control -sin estroma- presentó una menor concentración respecto a los cultivos con estroma. Los progenitores hematopoyéticos que fueron contabilizados como totales incluyen a los progenitores UFB-B, UFC-E, UFC-G, UFC-M, UFC-GM y UFC-GEMM. En la expansión de los progenitores hematopoyéticos totales, no se observó efecto significativo entre los cultivos con y sin estroma. (**figura 5.13b**). En las **figuras 5.13c** y **5.13d** se muestran las cinéticas de consumo de glucosa y generación de lactato, respectivamente. En general se puede destacar que la cinética de generación de lactato es una imagen especular de la cinética de consumo de glucosa, lo cual sugiere un alto requerimiento energético que se satisface por la vía glicolítica. Se observa que en la primera etapa en el cultivo control se consumió 0.5 g/L de glucosa mientras que los cocultivos demandaron de 1.65 a 2.72 g/L. Esto posiblemente como consecuencia de la demanda de energía por las células estromales. La velocidad específica de generación de lactato global fue de  $0.26 \times 10^{-10} \text{ mmol/cel.h}$  para el cultivo sin estroma y de 0.7 a  $0.86 \times 10^{-10} \text{ mmol/cel.h}$  para los cultivos con estroma. La alta producción de lactato originada por la presencia del estroma causó cambios drásticos en el pH del medio de cultivo y constituye un problema adicional en la realización de los cocultivos.

En la **figura 5.14** se muestra en resumen la máxima expansión celular y de progenitores considerando tanto la fracción de células suspendidas como de células adherentes, en cocultivos de tres muestras diferentes de SCU. Se observa que en los cocultivos Est-MCF y en medio sin citocinas (IMDM) no se presentó expansión significativa. Por el contrario, la expansión celular y de progenitores fue de más de 6 y 4 veces, respectivamente, cuando se utilizó medio con citocinas en los cultivos con y sin estroma (Est-Cit y Cit, respectivamente). Al comparar los cultivos con y sin estroma, no se observó un efecto importante del estroma sobre la expansión celular y de progenitores hematopoyéticos.

---

<sup>1</sup> Estas células fueron proporcionadas por la Ing. Berdugo y la metodología se detalla en Berdugo (1999).



**Figura 5.12. Cocultivo de células estromales y células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical al inicio del cultivo (10x).** En la parte posterior se encuentra el estroma preformado y encima las células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical.

La utilidad del estroma en cocultivos ha sido muy estudiada y en general, se menciona que el estroma es indispensable para mantener a las células conocidas como células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC), que en cierta forma es un método para evaluar la presencia de la célula seminal hematopoyética. En este punto, cabe resaltar los trabajos de Verfaillie (1993), que realizó el cultivo de células  $\text{Nhl}^-/\text{CD34}^+/\text{HLA-DR}^-$  ( $\text{DR}^-$ ) libres de estroma y con estroma sin contacto directo. Ambos cultivos realizados con y sin citocinas en forma individual o en combinación entre ellas. Sus resultados mostraron que las células  $\text{DR}^-$  en los cultivos libres de estroma y suplementados con IL-3, SCF, LIF y G-CSF resultaron en una expansión similar que los cultivos con estroma sin contacto suplementados con las mismas citocinas. Sin embargo, la generación de progenitores y conservación de las células LTC-IC, fue superior en los cultivos con estroma sin contacto con y sin IL-3 -suministrada sola o en combinación con SCF, LIF y G-CSF- que los cultivos sin estroma. Cabe resaltar que en todos los casos la cantidad de LTC-IC fue menor que el control al día cero. Concluyen que el estroma de médulas ósea aporta factores solubles que actúan solos o en sinergismo con diversas citocinas: 1) conservando a las LTC-IC, 2) induciendo la diferenciación temprana de una fracción de progenitores primitivos y 3) previniendo la diferenciación terminal.

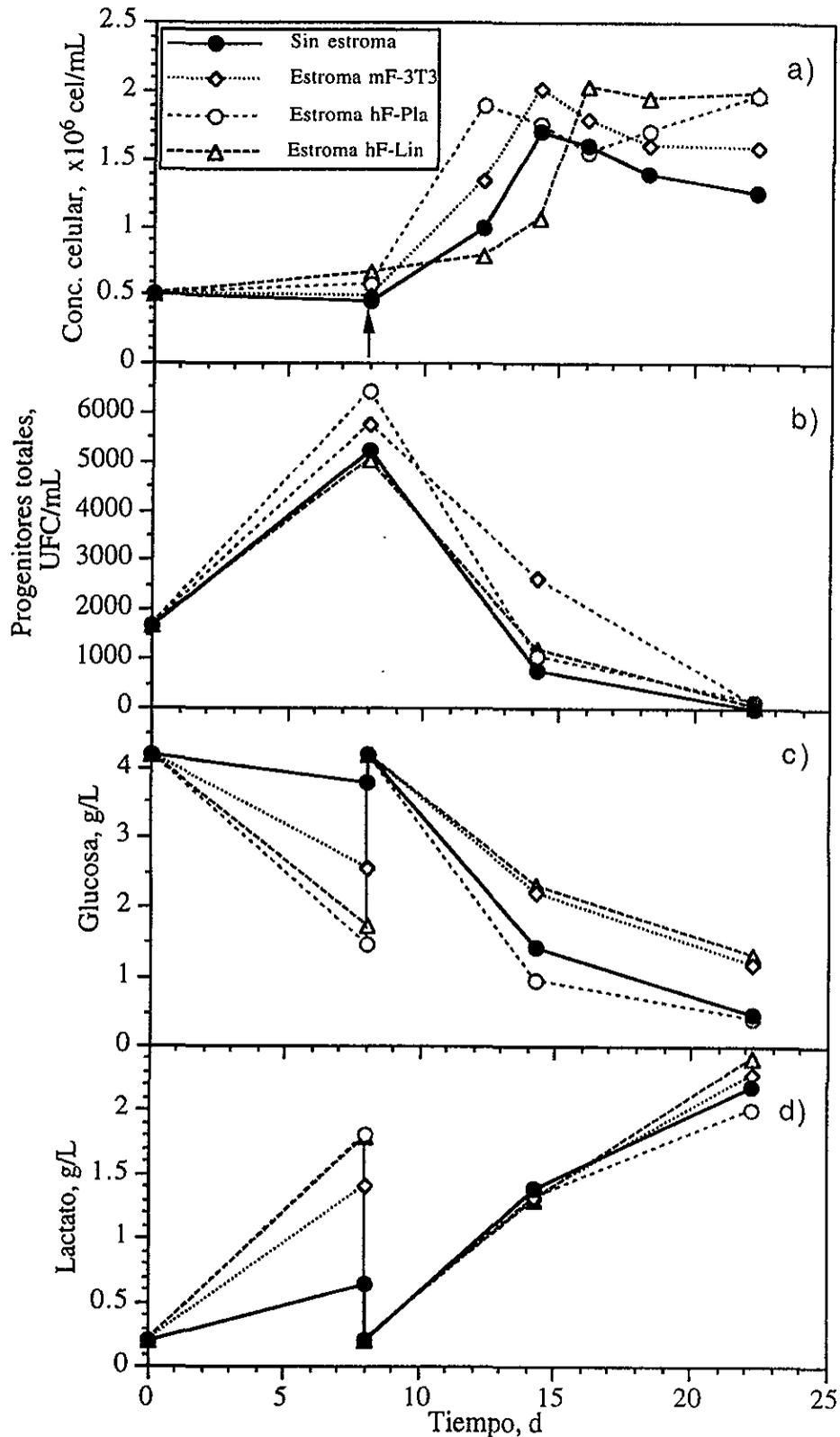
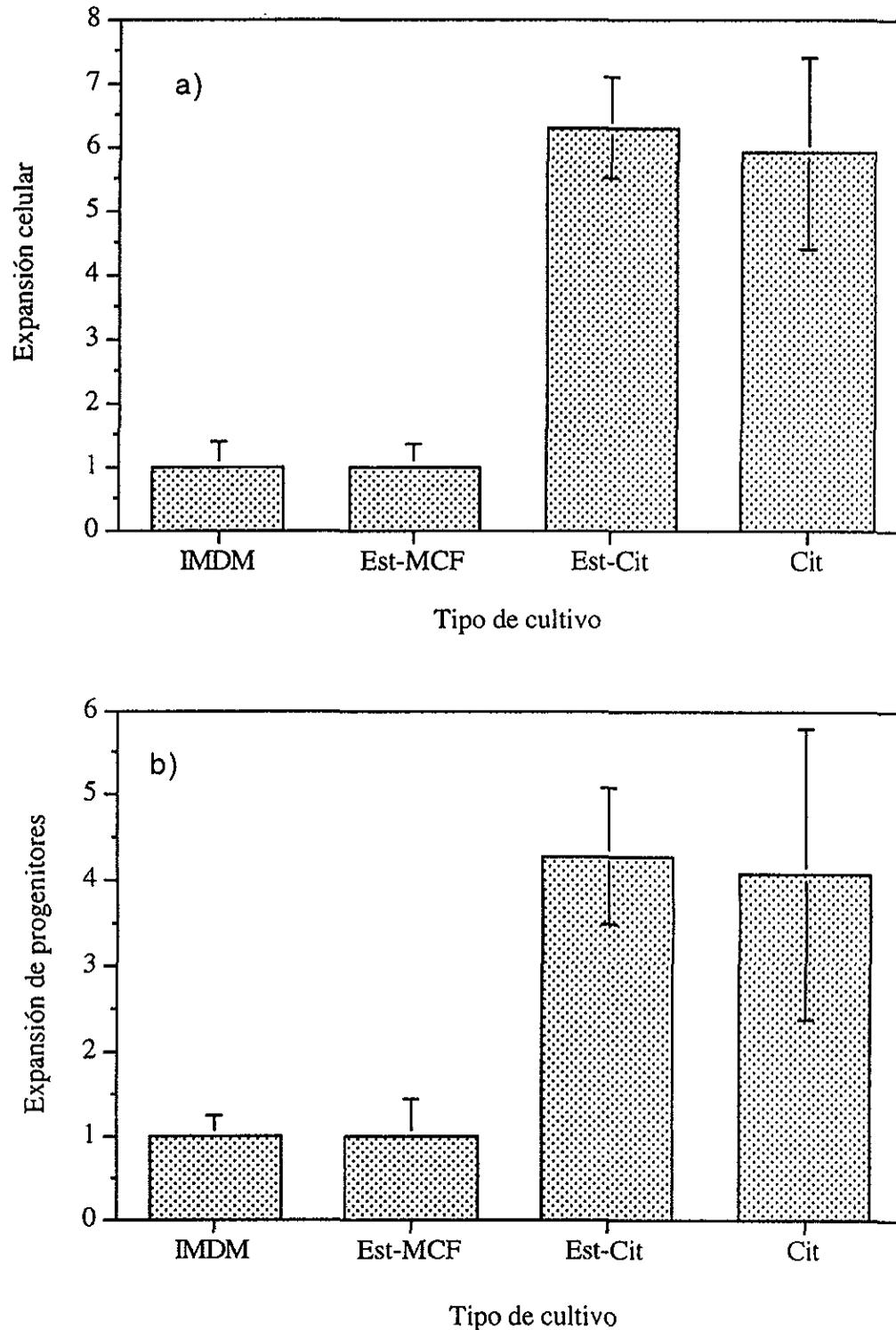


Figura 5.13. Expansión de células hematopoyéticas en diferentes estromas. ( $\uparrow$ ) indica recambio de medio. Los cocultivos se iniciaron sobre un estroma preformado y en confluencia. Se utilizó medio IMDM-MTC.

En un trabajo posterior, Verfaillie y Catanzaro (1996) realizaron cocultivos de células NhL-/CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> con estroma de médula ósea con y sin contacto con la capa de fibroblastos. Sus resultados mostraron que hubo una mayor pérdida de células LTC-IC cuando las células son cultivadas directamente sobre el estroma, que cuando se utiliza una membrana de separación. Concluyen que el contacto directo con el estroma inhibe la proliferación o sobrevivencia de las células LTC-IC. Sin embargo, Breems y col., (1998), demostraron que el contacto con el estroma previene la pérdida de la capacidad proliferativa de las células CD34<sup>+</sup> obtenidas de sangre periférica. Cabe resaltar que las células estromales utilizadas son de una línea celular FBMD-1. Roy y Verfaillie (1997) demostraron que las células hematopoyéticas de hígado fetal -en particular los progenitores UFB-E- morían por inducción de apoptosis cuando se cocultivaron con células estromales de médula ósea de adultos. Al parecer esto fue originado por ciertos factores producidos por el estroma.

Koller y col. (1995a) reportaron que la expansión de LTC-IC es dependiente del estroma, resaltando la necesidad de la presencia de células accesorias (monocitos y linfocitos T). Encontraron que en los cultivos sin estroma hubo pérdida de las LTC-IC.

Sandstrom y col. (1996), realizaron cultivos de células hematopoyéticas de sangre periférica y de médula ósea en cultivos en biorreactor de perfusión y estáticos, utilizando medio con citocinas con y sin estroma. Mencionan que el estroma es útil ya que produce matriz extracelular y citocinas. Sin embargo, el uso de estroma es indeseable para aplicaciones clínicas y de investigación, debido a que el efecto y la composición del estroma es muy variable, sujeto a alta manipulación y problemas técnicos. Sus resultados muestran que no hay efecto del estroma sobre la expansión de células mononucleares, UFC-GM, ni en el conteo de LTC-IC. Koller y col. (1996) evaluaron el efecto del inóculo de células hematopoyéticas de médula ósea con y sin estroma utilizando medio con citocinas, no se observaron efectos en la expansión de células mononucleares y UFC-GM con y sin estroma a inóculos superiores a  $1 \times 10^5$  cel/mL. Respecto a las LTC-IC, encontraron que los cultivos sin estroma fueron más eficientes.



**Figura 5.14.** Máxima expansión celular y de progenitores hematopoyéticos totales en los cultivos con (Est-MCF y Est-Cit) y sin estroma (Cit y IMDM) en diferentes medios de cultivo. Las datos muestran el promedio de tres muestras diferentes de sangre de cordón umbilical y las barras indican la desviación estandar.

## 5.5 Cocultivos cíclicos

Posteriormente se realizaron cocultivos cíclicos con la finalidad de evaluar hasta cuantas veces es posible mantener la expansión de las células hematopoyéticas y de ser posible maximizar la concentración celular.

La **figura 5.15** muestra un cocultivo típico de células hematopoyéticas sobre un estroma preformado, otros cocultivos cíclicos se muestran en el **apéndice A**. Se observa que en general fue posible realizar hasta tres ciclos de recambio de medio de cultivo (solo se realizaron tres ciclos de cultivo debido al daño en la capa estromal ocasionado por la intensa manipulación). En el primer ciclo se logró la mayor expansión de progenitores de hasta 5 veces y fue disminuyendo en los ciclos siguientes (**figura 5.15a**). Respecto a la expansión celular fue posible lograr incrementos de 6 a 10 veces, en los ciclos de recambio que fueron realizados (**figura 5.15b**). El consumo de glucosa y generación de lactato se muestran en las **figuras 5.15c y 5.15d**, respectivamente. Se observa que se presentó una alta actividad glicolítica con un coeficiente de rendimiento de 1.6 a 2.1 mol<sub>lactato</sub>/mol<sub>glucosa</sub>. Adicionalmente, se presentó acumulación de amonio, esto debido posiblemente, a que la generación de amonio por la descomposición espontánea y la vía metabólica, es mayor que la capacidad de consumo por las células estromales (**figura 5.15d**).

La expansión acumulada estimada se muestra en la **figura 5.15e**. Considerando los tres ciclos del cocultivo se alcanzó una expansión de progenitores de hasta 18.5 veces y una expansión celular de 382 veces. Al analizar tres diferentes cocultivos cíclicos, se obtuvo una expansión celular calculada de  $277 \pm 170$  y para progenitores hematopoyéticos de  $15 \pm 7.9$  veces. Estos resultados concuerdan con las expansiones acumuladas de cultivos cíclicos reportados por Collins y col. (1998a), quienes encontraron una expansión celular acumulada de 200 a 380 veces y de 12 a 22 veces para UFC-GM.

Cabe resaltar que en los cultivos cíclicos, cuando se realizó el primer recambio de medio de cultivo, las células fueron centrifugadas y regresadas al cultivo. De tal forma que no pueden ser considerados como cultivos a largo plazo, en donde al recambiar el medio de cultivo, siempre se descarta la mitad de la fracción de células suspendidas.

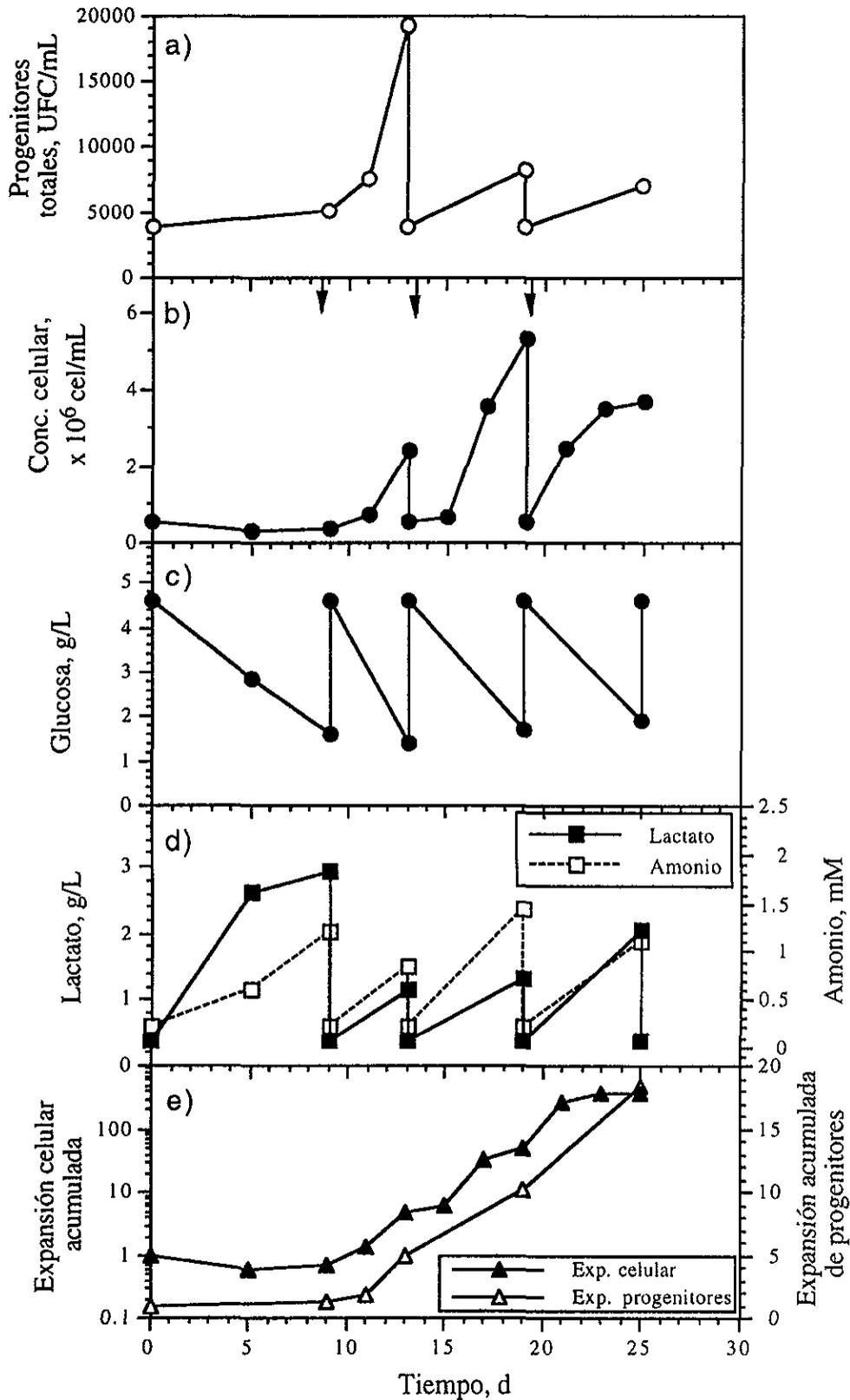


Figura 5.15. Cinética de crecimiento en los cocultivos con tres ciclos. (↓) indica recambio de medio IMDM-MTC. En el primer recambio, las células fueron regresadas al cultivo.

## 5.6 Cultivos estáticos por lote a partir de células CD34<sup>+</sup>

Como se discutió en la sección 2.2.3, el marcador CD34<sup>+</sup> ha sido considerado como el marcador para identificar a la población de células que contiene a la CSH y a los progenitores hematopoyéticos. Con la finalidad de evaluar la expansión de células hematopoyéticas a partir de células CD34<sup>+</sup>, se realizaron cultivos estáticos por lote a partir de estas células.

Al realizar la purificación por selección negativa, el porcentaje de células recuperadas fue de 0.62 y 0.74 % para las muestras 1 y 2, respectivamente. En progenitores se obtuvo un enriquecimiento de 5.3 a 96 UFC/10<sup>3</sup> cel y 3.24 a 39.5 UFC/10<sup>3</sup> cél para las muestras 1 y 2, respectivamente. En la **figura 5.16** se muestra las cinéticas de crecimiento de los cultivos estáticos por lote, a partir de inóculos de células CD34<sup>+</sup>, de SCU. Se observa que fue posible lograr expansiones celulares de 60 veces para la muestra 1 y de hasta 360 veces para la muestra 2. La **figura 5.17** muestra un cultivo de células CD34<sup>+</sup>, en donde se realizaron dos ciclos de cultivo. Se observa que se logró incremento en la población de  $20 \times 10^3$  a  $1.2 \times 10^6$  cel/mL en el primer ciclo y de  $20 \times 10^3$  a  $0.45 \times 10^6$  cel/mL en el segundo, lo que representa una expansión celular acumulada calculada de 1200 veces. Respecto a los progenitores hematopoyéticos se alcanzó una expansión de 30 veces. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Haylock y col. (1992) que reportaron el cultivo de células CD34<sup>+</sup>, utilizando bolsas de cultivo de 50 mL y utilizando diferentes combinaciones de citocinas. Cuando utilizaron 60 ng/mL de citocinas, alcanzaron una expansión celular de hasta 1324 veces y para progenitores de 22 hasta 57 veces.

En la actualidad, en la mayoría de los trabajos de expansión *in vitro* de células hematopoyéticas, se prefiere realizar los experimentos con poblaciones purificadas de células CD34<sup>+</sup>, más que con el conjunto de células mononucleares procedentes del gradiente de Ficoll (Brugger y col., 1993; Henschler y col., 1994; Möbest y col. 1998). Esto se debe a que con el uso de fracciones celulares enriquecidas mediante diversas técnicas de separación, se tiene la ventaja de que se descartan los eventos originados por las células maduras. Por ejemplo, se descarta la muerte celular de las células diferenciadas, se reducen tanto los consumos de sustratos, como la generación de desechos metabólicos tóxicos. Esto da como resultado que, en los cultivos a partir de células CD34<sup>+</sup>, haya una reducción o eliminación de la fase lag de los cultivos, se obtiene una mayor expansión celular y de progenitores hematopoyéticos.

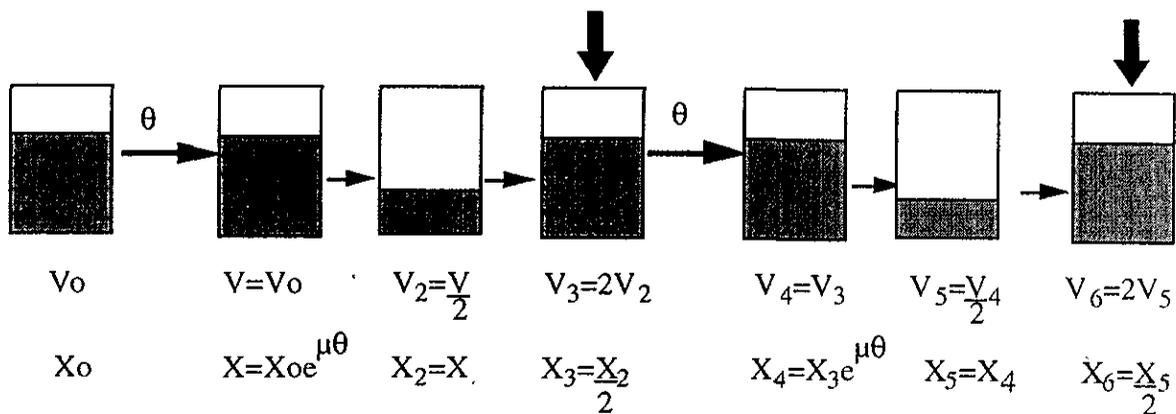
## 5.7 Modelamiento cinético de los cultivos a largo plazo

Los cultivos a largo plazo han sido utilizados tradicionalmente para la evaluación de las LTC-IC. Los cultivos se realizan generalmente en placas multipozo con o sin estroma preformado. La metodología consiste en recambiar cierto volumen del medio de cultivo metabolizado por medio fresco, a un tiempo preestablecido. Con esto se descarta la mitad de las células no-adherentes, mientras que la población de las células adherentes prácticamente no es alterada. En la **figura 5.18** se muestra la estrategia seguida para realizar los cultivos a largo plazo. El esquema sugiere que el sistema se comporta como un cultivo por lote en serie o en forma consecutiva. A continuación se propone un modelo cinético que pretende explicar el comportamiento de los cultivo a largo plazo.

En un cultivo por lote tradicional, el crecimiento celular está definido como:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (5-2)$$

En los cultivos a largo plazo el volumen del cultivo se puede considerar constante durante la mayor parte del tiempo ( $dV/dt = 0$ ). Sin embargo, el sistema es sometido a perturbaciones en forma de impulsos cíclicos (**figura 5.18 y 5.19a**). De tal forma que el volumen se aleja periódicamente del estado basal.



**Figura 5.18. Metodología de los cultivos a largo plazo.** Las ecuaciones de crecimiento son validas solo para  $t = \theta, 2\theta, 3\theta$ , etc.

Si el cultivo se realiza de tal modo que el tiempo de recambio ( $\theta$ ) y el volumen de medio metabolizado residente al agregar medio fresco ( $V_r$ ) sean constantes, y haciendo:

$$\eta = \frac{1}{\theta} \quad (5-3)$$

donde  $\eta$  es la dilución aparente.

Definiendo el factor de recambio ( $f$ ) como la relación del volumen inicial ( $V_0$ ) y el volumen de medio metabolizado residente antes de agregar el medio fresco ( $V_r$ ) tenemos,

$$f = \frac{V_0}{V_r} \quad (5-4)$$

Considerando las ecuaciones (5-2) a (5-4) se obtiene,

$$X = X_0 e^{\mu t} (f^{-\eta t}) \quad (5-5)$$

Derivando la ecuación (5-5) con respecto al tiempo, se obtiene:

$$\frac{dX}{dt} = [\mu - \eta \text{Ln}(f)] X_0 e^{\mu t} f^{-\eta t} \quad (5-6)$$

La ecuación (5-6) es válida únicamente para  $t = \theta, 2\theta, 3\theta$ , etc. y establece el perfil de la concentración celular en los cultivos a largo plazo. Dada la similitud con la ecuación de los quimiostatos, es posible decir que el comportamiento cinético de los cultivos a largo plazo, pueden ser considerados como *pseudo*-quimiostatos, siempre y cuando exista, una frecuencia alta de recambio de medio de cultivo.

La velocidad específica de crecimiento aparente ( $\mu_{\text{apa}}$ ) puede ser obtenida de su definición.

$$\mu_{\text{apa}} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (5-7)$$

Sustituyendo las ecuaciones (5-5) y (5-6) en (5-7):

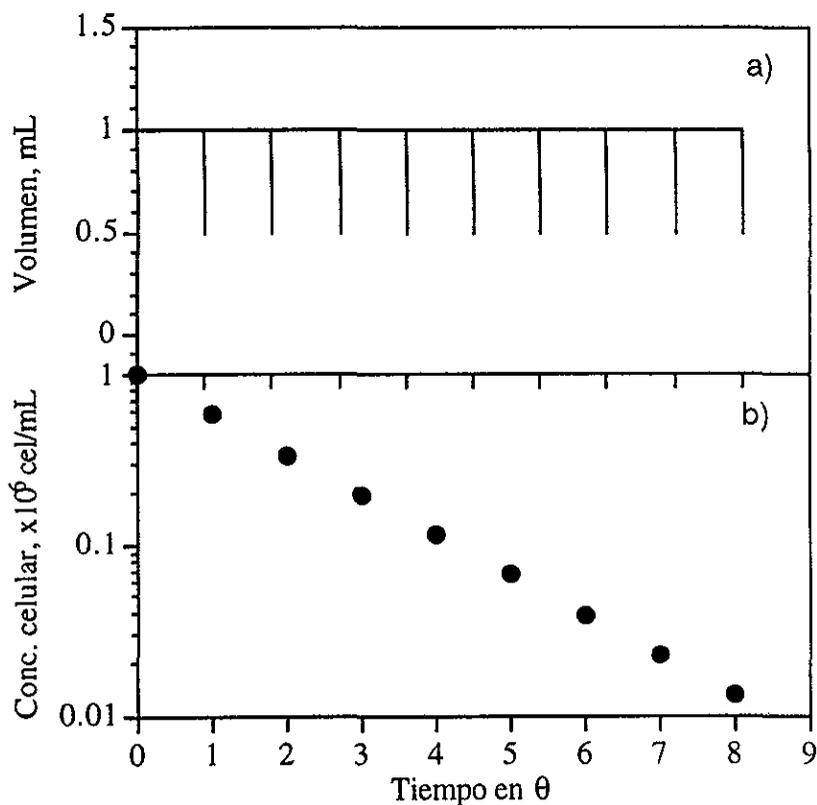
$$\mu_{\text{apa}} = \mu - \eta \text{Ln}(f) \quad (5-8)$$

Rearreglando la ecuación (5-8) se puede obtener la velocidad específica de crecimiento.

$$\mu = \mu_{\text{apa}} + \eta \text{Ln}(f) \quad (5-9)$$

Debido a que los cultivos de células hematopoyéticas contienen diversas especies celulares que pueden tener  $\mu$  diferentes, el valor de  $\mu$  obtenida por este modelo, es un valor promedio.

La **figura 5.19** muestra el comportamiento teórico de la concentración celular en un cultivo a largo plazo y la **figura 5.20** muestra los datos experimentales de dos cultivos a largo plazo de SCU reportados por Mayani y col. (1998). Se observa que el modelo predice la tendencia de los datos experimentales. El modelo cinético puede ser de gran utilidad para realizar un análisis más profundo de los cultivos, así como plantear un diseño experimental manipulando los parámetros de recambio ( $\eta$  o  $f$ ) y las condiciones de cultivo. Por ejemplo, Koller y col. (1992), realizaron cultivos a largo plazo (con aire y medio sin citocinas) y los compararon con cultivos a 5 % de oxígeno y con factores de crecimiento. En la **figura 5.21** se muestran los datos experimentales y el ajuste del modelo. Se observa que este, se ajusta muy bien a los datos experimentales. En la **tabla 5.1** se muestran las velocidades específicas de crecimiento obtenidas por el modelo cinético. Se observa que los valores son menores a la  $\mu$  reportada para otras células de mamífero (Higareda y col. 1997; Palomares y Ramírez 1996). Las diferencias en la  $\mu$  obtenidas para las muestras de SCU posiblemente fueron debidas a la condiciones de cultivo en las que fueron realizados.



**Figura 5.19.** Modelamiento cinético de los cultivos a largo plazo.

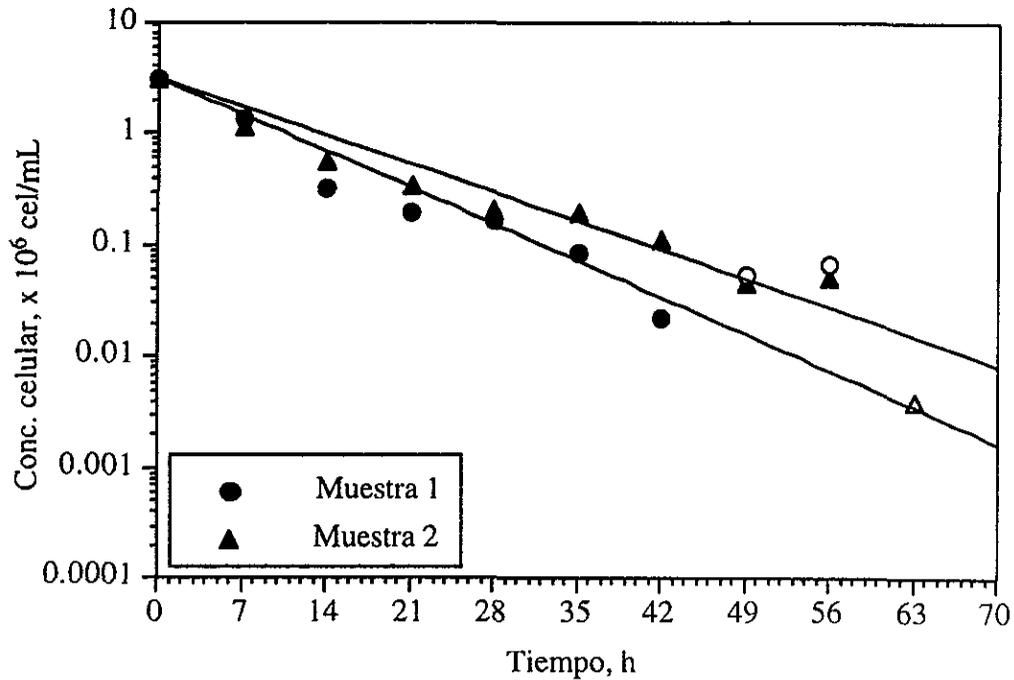


Figura 5.20. Ajuste de los datos experimentales de Mayani y col. (1998) al modelo cinético. La regresión se tomó para los símbolos sólidos.

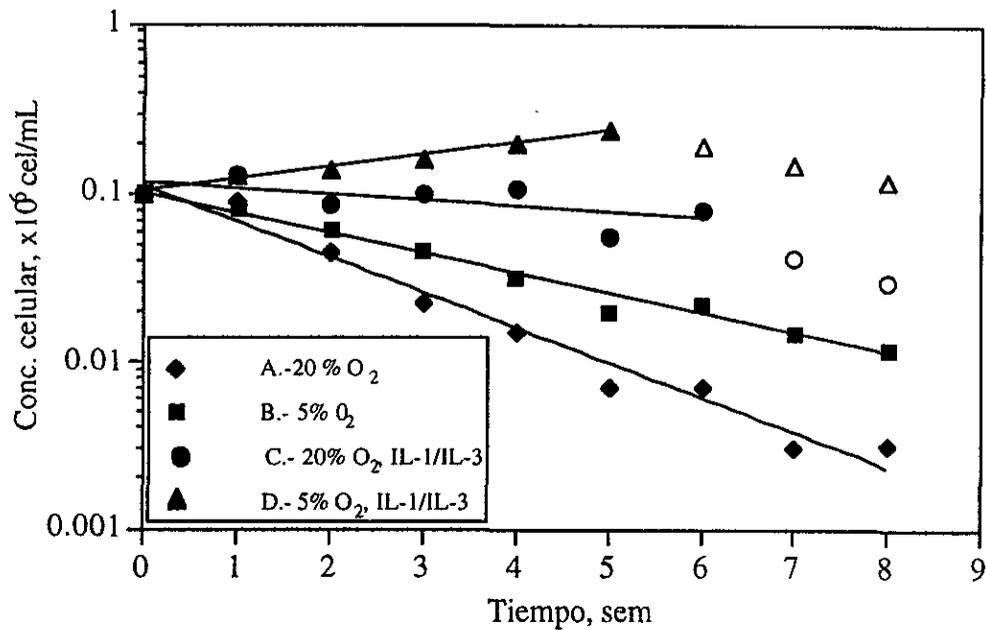


Figura 5.21. Ajuste de los datos experimentales de Koller y col. (1992) al modelo cinético propuesto. La regresión se tomó para los símbolos sólidos.

**Tabla 5.1. Velocidad específica de crecimiento obtenida por el modelo cinético para diferentes muestras de células hematopoyéticas.**

Cultivo	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	Referencia
1	0.016	Mayani y col.1998
2	0.024	Mayani y col.1998
A	0.210	Koller y col. (1992)
B	0.421	Koller y col. (1992)
C	0.615	Koller y col. (1992)
D	0.859	Koller y col. (1992)

## 5.8 Diseño y caracterización del minibioreactor

El artículo titulado “**Design, characterization, and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions**” publicado en *Cytotechnology* 28 (1-3): 127-138 (1998), describe: a) la construcción del minibioreactor y el sistema de control y adquisición de datos, b) la caracterización dinámica del equipo, c) las condiciones operacionales de los cultivos, d) el perfil de las variables controladas y manipuladas en los cultivos de células hematopoyéticas y e) la medición de variables de proceso como la velocidad de consumo de oxígeno y el potencial redox del cultivo

Este artículo, tiene la importancia en que se muestra por primera vez, el cultivo de células hematopoyéticas en donde se monitorea en línea la velocidad de consumo de oxígeno y el PRC, bajo condiciones controladas. En el **apéndice B**, se incluye un esquema de las dimensiones del minibioreactor. En el **apéndice C** se incluye un cultivo a 10 % OD realizado con este equipo, en donde la expansión de los progenitores totales, UFC-GM y de células totales fue de 9.2, 10 y 14 veces, respectivamente.



## Design, characterization, and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions

Antonio De León<sup>1</sup>, Héctor Mayani<sup>2</sup>, & Octavio T. Ramírez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México.

E-mail: tonatiuh@ibt.unam.mx

<sup>2</sup> Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, D. F., México.

Received 7 April 1998; accepted 27 August 1998

**Key words:** Expansion, hematopoiesis, monitoring, oxygen uptake rate, redox potential, umbilical cord blood.

### Abstract

The *in vitro* culture of human hematopoietic cells has recently received considerable attention due to its clinical importance. Most studies of the culture and expansion of hematopoietic cells have been performed in static cultures but only very few reports exist on the use of bioreactors where strict control of environmental variables is maintained. In this work, the design, characterization and application of a fully instrumented minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells from umbilical cord blood is presented. The system consists of a stirred-tank reactor where cells are maintained in suspension in an homogeneous environment and without the need of a stromal feeding layer. The minibioreactor was coupled to a data acquisition and control system which continuously monitored pH, dissolved oxygen and redox potential. When operated at 75 rpm with a hanging magnetic bar (impeller-to-tank diameter ratio of 0.57), the dead and mixing times were 120 s and 80 s, respectively, and the maximum response rate and volumetric oxygen transfer coefficient were  $0.8 \text{ mM O}_2\text{h}^{-1}$  and  $1.8 \text{ h}^{-1}$ , respectively. Such characteristics allowed a tight control of pH (until day 11) and dissolved oxygen at predetermined set-points, and up to a 7-fold expansion of hematopoietic progenitors was possible in cultures maintained at 20% dissolved oxygen with respect to air saturation. Growth phase and cell concentration could be inferred on-line through determinations of oxygen uptake rate and culture redox potential. Oxygen uptake rate increased during exponential growth phase to a maximum of  $40 \mu\text{Mh}^{-1}$ . Such an increase closely followed the increase in concentration of hematopoietic progenitors. In contrast, culture redox potential decreased during exponential growth phase and then increased during death phase. The designed system permits not only the maintenance of controlled environmental conditions and on-line identification of fundamental culture parameters, but also the application of control strategies for improving expansion of hematopoietic cells.

**Abbreviations:** CFU- colony forming units; CRP- culture redox potential;  $t_d$ - dead time of the system; DO- dissolved oxygen; HHC- human hematopoietic cells; MNC- mononucleated cells; MRR- maximum response rate;  $t_m$ - mixing time; OUR- oxygen uptake rate;  $k_L a$ - volumetric oxygen transfer coefficient.

### Introduction

In recent years, *in vitro* culture of human hematopoietic cells (HHC) has experienced a growing

interest which has been fostered by various applications where the expansion of stem and progenitor cells or the generation of mature cells, such as erythrocytes and platelets, is required. A special attention has received the blood from umbilical cord

---

\* Author for all correspondence

due to its important advantages over other HHC sources (Mayani and Lansdorp, 1998), such as bone marrow and peripheral blood. Most of the information in the field of expansion of HHC has been generated using static cultures, usually multiwell plates, dishes, and flasks of culture volumes ranging between 0.1 to 10 mL. Particularly, the so called "long term culture" has been widely used as an experimental tool for the study of hematopoiesis *in vitro* (Mayani et al. 1990, 1993, and 1998). However, the utility of all such systems for quantitative kinetic and metabolic studies is limited due to the reduced volume available and the impossibility of maintaining controlled and homogeneous conditions of environmental variables, including pH and dissolved oxygen (DO).

Expansion of HHC in various bioreactor configurations has been recently demonstrated. For instance, Sardonini and Wu (1993) reported the expansion of HHC in small scale, non-instrumented air-lift, microcarrier, and agitated suspension bioreactors. In particular, their results showed that only the suspension bioreactor gave a better expansion than static cultures. Zandstra et al. (1994) also found that the use of microcarriers did not improve the performance of suspension cultures. Encapsulation in alginate beads (Levee et al., 1994) or immobilization in hollow fibers (Sardonini and Wu, 1993) has also been explored for human bone marrow cultures. However, separation of cells from these systems, as well as from microcarriers, can represent an important problem when harvesting HHC. Perfusion has been a preferred mode of operation, as depleted nutrients are continuously provided to the cells while metabolized medium is removed (Koller et al., 1993; Sandstrom et al., 1996). Although perfusion systems have been shown to perform adequately in the presence or absence of a stromal layer, several limitations and disadvantages persist. For instance, costly medium is inefficiently used and the systems are inherently heterogeneous, which can result in concentration gradients and difficulty in monitoring, controlling, cell sampling, and cell harvesting.

In contrast to static cultures and immobilized bioreactor systems, instrumented stirred-tank bioreactors are especially suited for maintaining a constant and homogeneous environment through the application of simple control algorithms. Nevertheless, very scarce information exists on the use of computer-controlled and instrumented stirred-tank bioreactors for the culture of HHC, probably due to concerns of cell fragility and complications when a stromal layer is required. To our knowledge, the only report of the culture of HHC in a stirred-tank bioreactor system is a recent study by Collins et al. (1998). A similar control system was used by Pierson et al. (1996) for the *ex*

*vivo* expansion of human natural killer cells. In addition to the inherent concerns of using stirred-tank systems, for routine experimental purposes, the high cost of culture medium (as high as \$2 mL<sup>-1</sup>, if costs of cytokines are included) needed for HHC expansion makes prohibitive the use of commercially available stirred-tank bioreactors since relatively large volumes are required. In this work, the design characterization, and application of an instrumented stirred-tank minibioreactor for the culture of HHC maintained in an homogeneous suspension without a stromal layer, is presented. The system advantages include simple automatic measurement and control of the main culture variables through a computerized algorithm, and direct cell sampling and cell harvesting. The reactor volume was minimized in order to serve as an experimental tool where costly culture medium is optimized but enough volume remains to perform detailed kinetic characterizations. The utility of the developed system is exemplified by the expansion of HHC from umbilical cord blood cells. It is shown that on-line monitoring of oxygen uptake rate and culture redox potential can give fundamental information of the stage of the culture and cell concentration.

## Materials and methods

### *Design considerations*

The number of nucleated cells recovered from an umbilical cord is very limited, typically in the range of 40 to 200 X 10<sup>6</sup> cells. Accordingly, the main design consideration was to keep the bioreactor volume as small as possible in order to have an initial mononucleated cell concentration of at least 0.5 X 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>. Previous reports have shown the importance of initiating cultures with a critical minimum inoculum concentration (Levee et al., 1994; Collins et al., 1996). A minimum bioreactor volume would also optimize expensive media usage. On the other hand, the bioreactor should be large enough in order to accommodate commercial-size autoclaveable pH, DO, and redox potential sensors, and to allow repeated medium sampling for detailed analytical characterization. Based on such constraints, a bioreactor was constructed in a local workshop with a nominal volume of 500 mL and a working volume in the range of 75 to 250 mL. The resulting liquid height to vessel diameter ratio was between 0.45 to 1.2. The vessel (7 cm diameter, 13.5 cm total height) was constructed in borosilicate glass and the head plate in stainless steel. Ports (including those for electrodes) were made from Swagelok-type fittings.

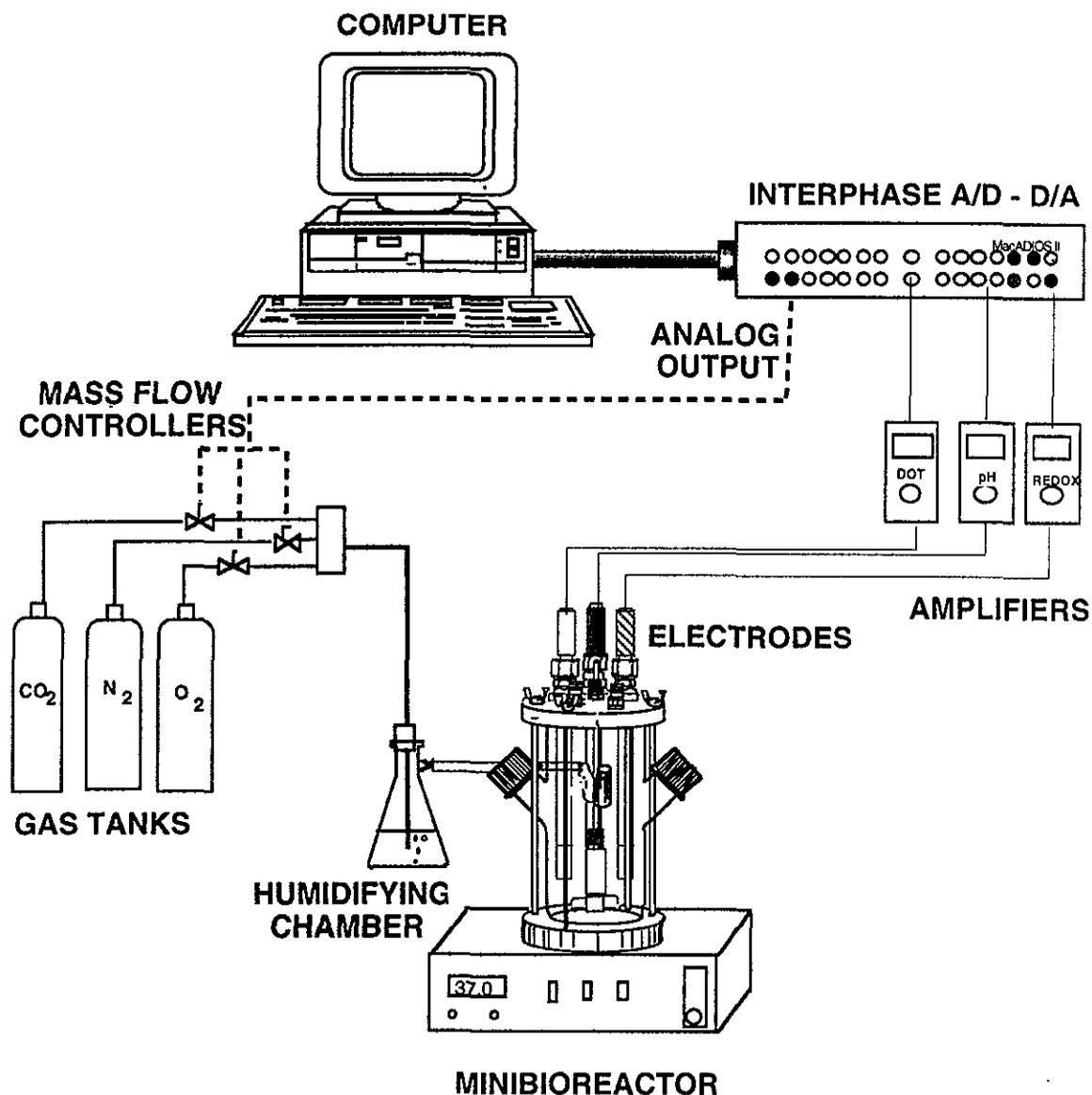


Figure 1. Schematic diagram of the minibioreactor and data acquisition and control system used for expansion of human hematopoietic cells.

### Bioreactor characterization

The bioreactor mixing time ( $t_m$ ) was determined with a pH sensor (Ingold; 20 s response time), following the response curve after acid and base pulses. The  $t_m$  was defined as the time needed to reach 95% of final pH reading after acid or base additions. The volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_L a$ ), maximum response rate (MRR), and dead time of the system ( $t_d$ ) were determined from the response curve of the system as measured from DO readings upon a step change in the oxygen partial pressure in the reactor headspace, as described elsewhere (Court, 1988). The physical characterization of the bioreactor was performed in

cell-free medium with agitation rates between 0 and 175 rpm, using a magnetically driven suspended bar (impeller-to-tank diameter ratio of 0.57).

### Cells and culture medium

Umbilical cord blood, obtained from the Regional General Hospital No. 1 (Instituto Mexicano del Seguro Social) was processed in a Ficoll gradient as described by Koller et al. (1993), to separate mononucleated cells (MNC). MNC were seeded in 25 cm<sup>2</sup> T-flasks and placed in an incubator (Precision) for 3 days at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, prior to their inoculation into the bioreactor or the control culture. Such a procedure was implemented as a

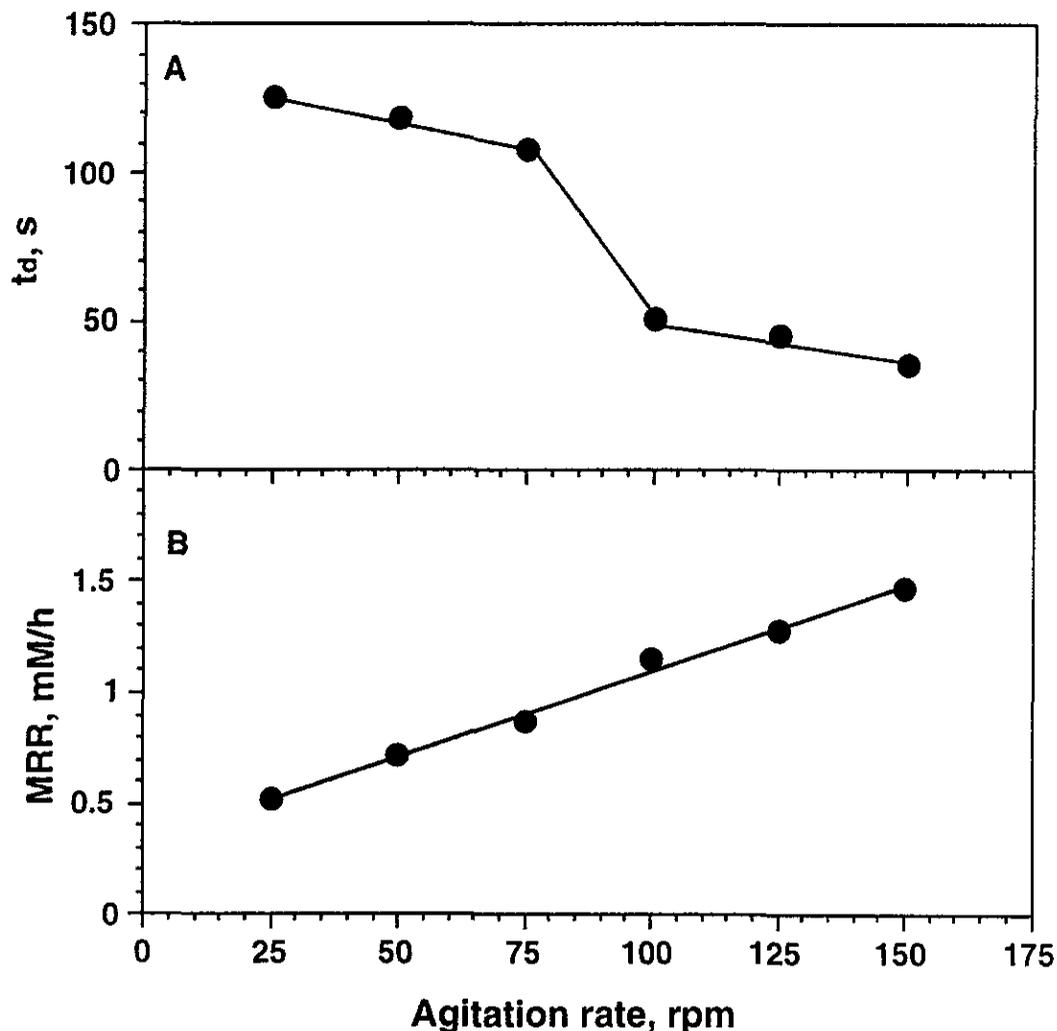


Figure 2. Effect of agitation rate on dynamic parameters of the system. A) dead time and B) maximum response rate. Continuous lines drawn only to show trend.

shortened quarantine to screen for possible microbial or fungal contamination in UCB samples. The medium used was IMDM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 1 ngmL<sup>-1</sup> interleukin-3 (IL-3, Promega), 5 ngmL<sup>-1</sup> stem cell factor (SCF, Peprotech), 1 ngmL<sup>-1</sup> granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF, Probiomed), 3 U mL<sup>-1</sup> erythropoietin (EPO, Cilag), 0.1 mgmL<sup>-1</sup> streptomycin, 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin, and 0.25 µgmL<sup>-1</sup> of amphotericin B (Sigma). Control cultures consisted of static 1-mL wells of a 24-well plate, inoculated from the same umbilical cord blood sample used in the bioreactor and performed simultaneously to the bioreactor cultures.

#### Bioreactor cultures

Batch cultures were performed using a working volume of 120 mL, agitated at 75 rpm, and

maintained at 37 °C. DO was measured with a polarographic sensor (Ingold) and is reported as percentage with respect to air saturation. DO was controlled at a predetermined value of 20% with respect to air saturation by a PID algorithm which varied the oxygen composition in inlet gas through mass flow controllers for N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (Brooks Inc.) while maintaining the total gas flow rate constant at 250 mLmin<sup>-1</sup>. pH was measured with an Ingold electrode and was controlled at 7.2 by manipulation of CO<sub>2</sub> partial pressure in the inlet gas flow by a proportional control algorithm. Culture redox potential was measured with a platinum sensor (pHoenix). DO, pH, CRP, and individual gas flow rates were acquired on-line with a Macintosh II-SI computer via a MacADIOS 411 (GW Instruments) A/D D/A interface.

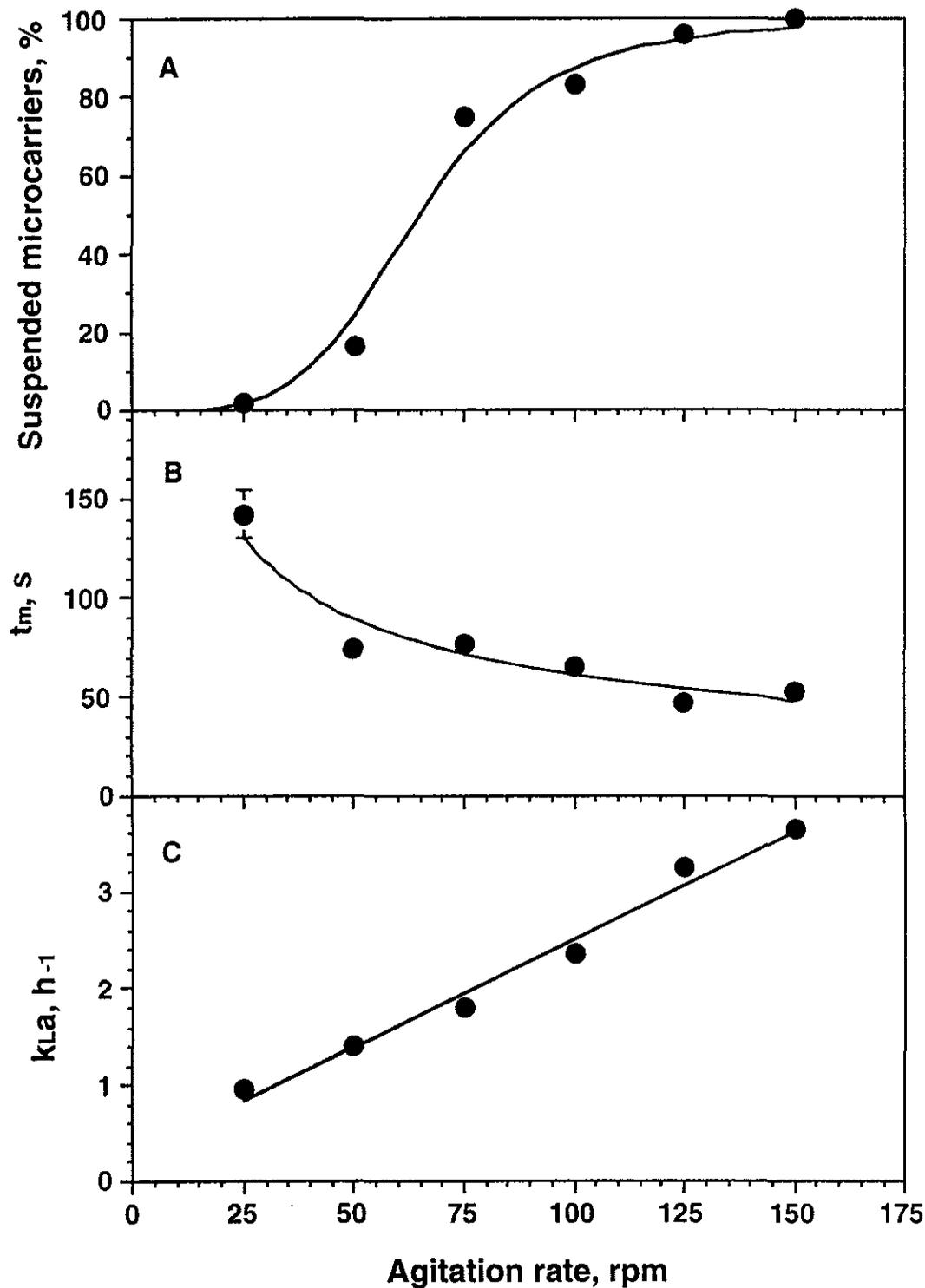


Figure 3. Effect of agitation rate on: A) percentage of suspended microcarriers ( $1 \text{ gL}^{-1}$  Cytodex-1); B) mixing time; and C) volumetric oxygen transfer coefficient. The gas flow was fixed to  $250 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Continuous lines drawn only to show trend. Data points correspond to average of two determinations. Error bars, except in one data point, are smaller than data symbols.

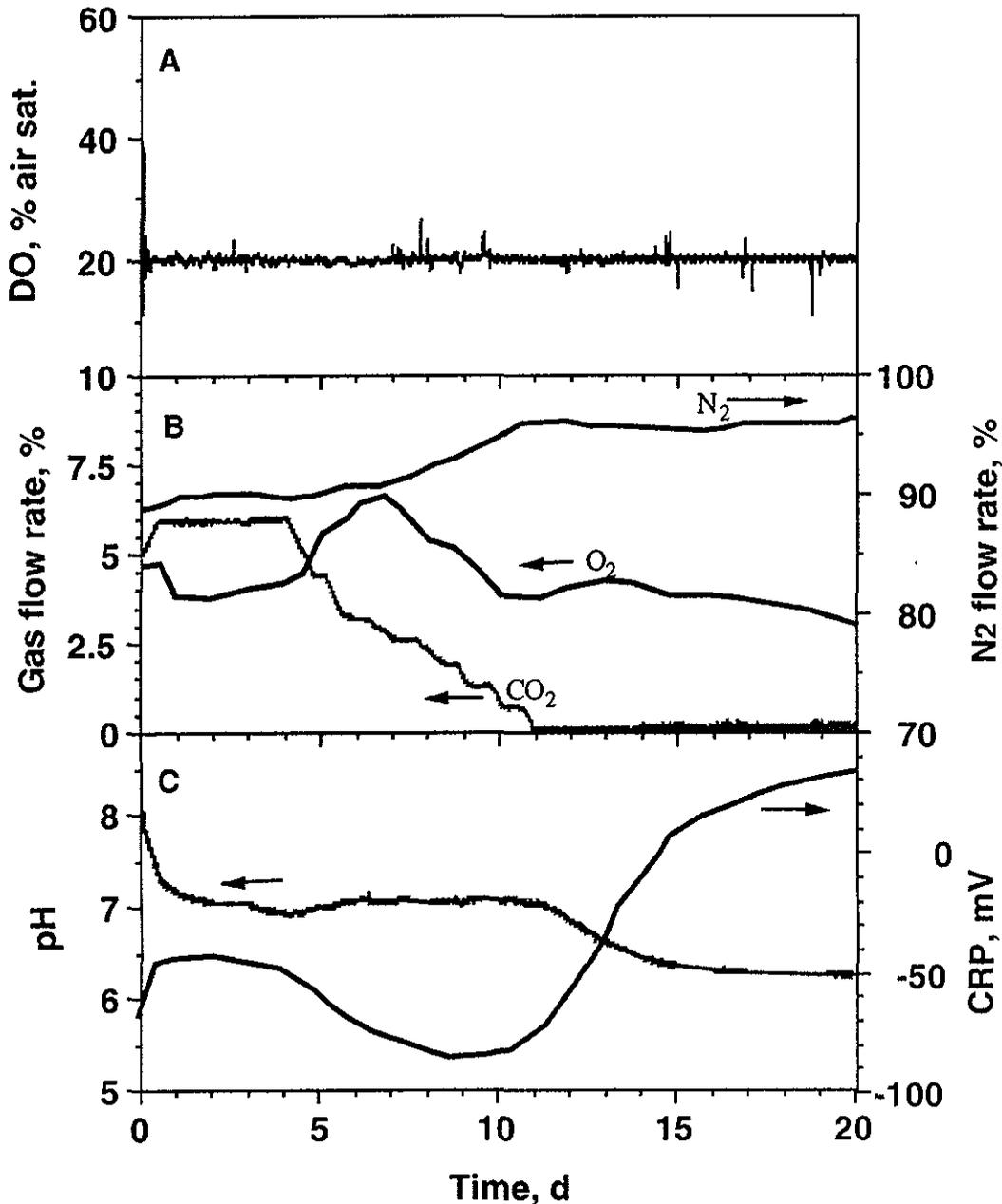


Figure 4. Typical behavior of a batch culture at 20% DO of human hematopoietic cells from umbilical cord blood. On-line acquired variables: A) DO; B) inlet gas composition (% with respect to total gas flow rate of 250 mLmin<sup>-1</sup>); C) CRP and pH profiles.

The control algorithms for DO and pH were written in Quick Basic® (Microsoft) and executed through the same A/D D/A interphase. Oxygen uptake rate (OUR) was determined on-line from a mass balance in the liquid phase according to equation 1:

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

where  $C_L$  and  $C^*$  are the oxygen concentration in the liquid phase and in equilibrium with the gas phase, respectively,  $t$  is time and  $i$  is the time discrete element.  $C_L$  is given directly by the DO electrode, while  $C^*$  can be calculated from the  $O_2$  partial pressure in the bioreactor headspace. Detailed description of assumptions leading to equation 1 can be found elsewhere (Palomares and Ramírez, 1996; Higareda et al., 1997).

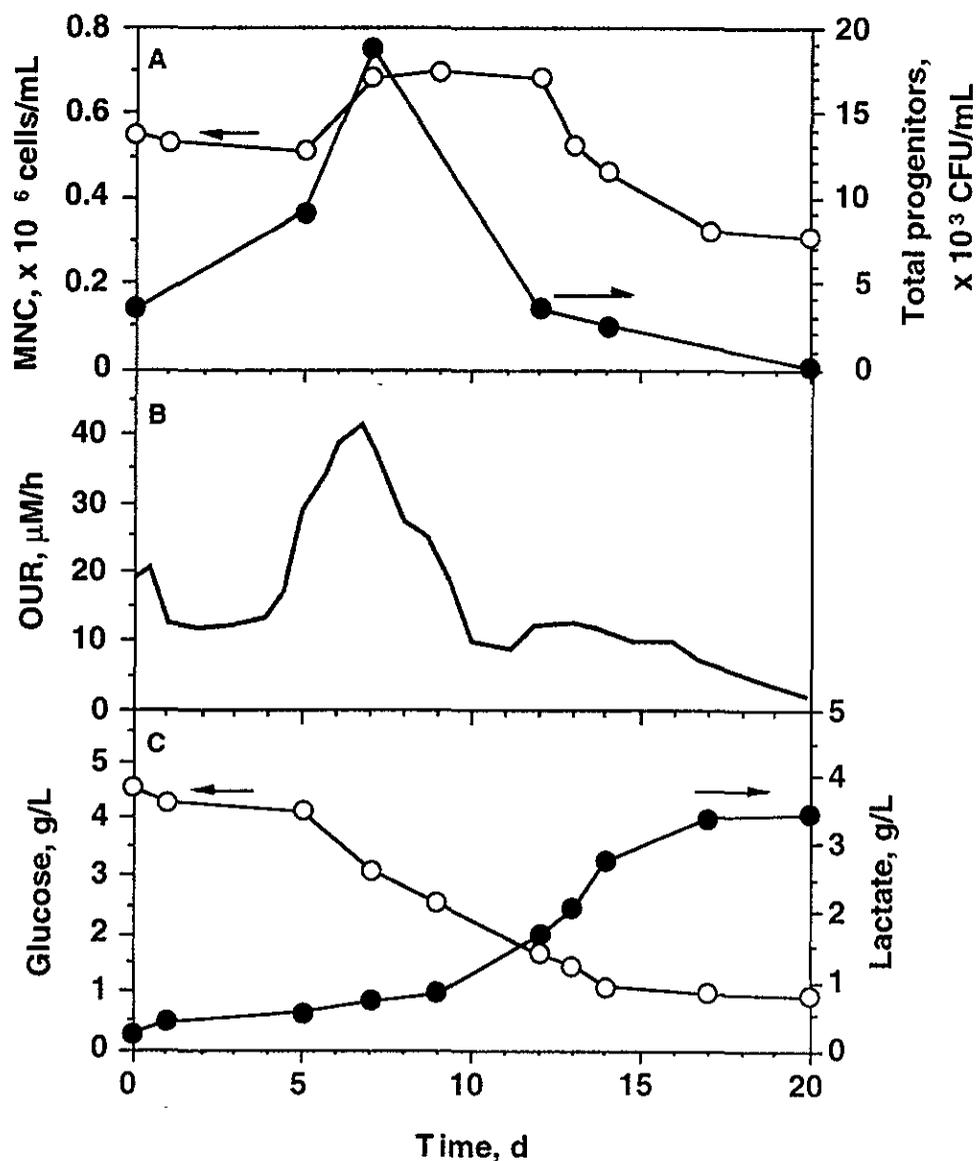


Figure 5. Typical behavior of a batch culture at 20% DO of human hematopoietic cells from umbilical cord blood. A) viable mononuclear cell concentration (○) and total progenitor concentration (●); B) oxygen uptake rate; C) glucose (○) and lactate (●) concentration.

#### Analytical methods

##### Clonogenic assay for progenitor cells.

Number of hematopoietic colonies was determined from methylcellulose-based semisolid cultures (Metho Culture; StemCell Technologies) containing  $50 \text{ ngmL}^{-1}$  SCF,  $10 \text{ ngmL}^{-1}$  IL-3,  $10 \text{ ngmL}^{-1}$  GM-CSF, and  $3 \text{ U mL}^{-1}$  EPO. Plates were inoculated with  $10,000$  to  $40,000 \text{ cellmL}^{-1}$  and incubated for 14 days at  $37^\circ \text{C}$  and  $5\% \text{ CO}_2$ . Hematopoietic colonies were classified as described previously (Mayani et al., 1990). A detailed description of the assay can be found elsewhere (Mayani et al., 1998).

Total cell concentration was determined in a Coulter Counter (Multisizer, Coulter Electronics) and viability by Trypan Blue exclusion using a hemacytometer. Glucose and lactate were determined from culture supernatants using a YSI 2700 (Yellow Spring Instruments) analyzer.

#### Results and discussion

In Fig. 1, a schematic of the minibioreactor/data acquisition and control system designed is shown. The glass vessel included two side ports for inoculation and sampling, and two side arms for medium addition and removal for optional continuous or perfusion operation. The small

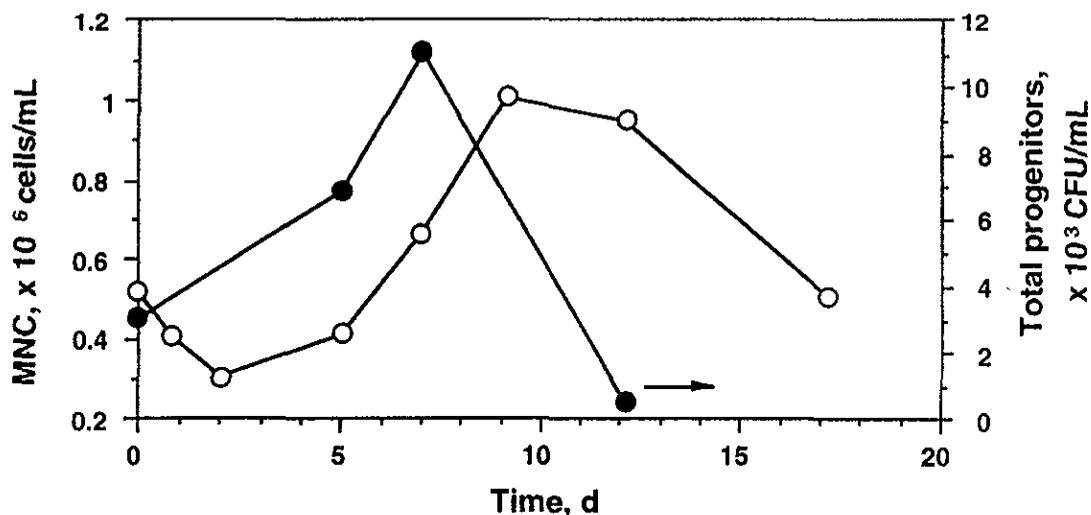


Figure 6. Static control culture performed in 1-mL wells of a 24-well-plate. Culture performed simultaneously and with same inoculum and medium as that in Figs. 4 and 5. Viable mononuclear cell concentration (○) and total progenitor concentration (●). Total MNC concentration not determined.

volume used and the relatively large gas flow rate to volume ratio, needed for accurate OUR determinations (see Palomares and Ramírez, 1996; and Higareda et al., 1997), resulted in large amounts of medium being evaporated. This was prevented with a humidifying chamber placed at the inlet gas stream. For applications requiring the generation of mature cells, such as transfusions of erythrocytes or platelets (McAdams et al., 1996b) or research involving mast cells (Saito et al., 1996), the stirred-tank configuration offers the advantage of a straightforward scale-up. In cases where the goal is transplants of hematopoietic cells in adults, then an expansion of at least  $2 \times 10^9$  mononucleated cells is required (calculated from Gluckman et al. 1989 and Kohli-Kumar et al., 1993). As shown below, based on the maximum oxygen transfer rate of the minibioreactor and the specific oxygen uptake rate of HHC, a single 250-mL bioreactor culture would be enough to generate the number of mononucleated cells required for an allogeneic transplant. Accordingly, for transplant applications, translation of the process to a clinical stage will not necessarily imply a volumetric increase of the culture, but rather warranting acceptability in safety and validation issues, including reproducibility. Such aspects are particularly satisfied in an homogeneous stirred-tank configuration.

#### Bioreactor characterization

The degree of homogeneity and the maximum oxygen transfer capacity are fundamental parameters of bioreactor performance. Therefore, a dynamic characterization of the minibioreactor was

performed. The effect of agitation rate on the dead time of the system ( $t_d$ ) and the maximum response rate (MRR), is shown in Fig. 2. MRR and  $t_d$  indicate the rate at which the system responds, and the lag time before the system responds, respectively, to a perturbation. It can be seen that above 75 rpm,  $t_d$  decreased from around 110 s, to about 40 s, and then remained relatively constant at such a value (Fig. 2a). In contrast, MRR linearly increased as agitation rate increased (Fig. 2b). Determination of MRR and  $t_d$  is important since such parameters define the PID control loop constants when using classical tuning methods such as the Ziegler and Nichols technique (Court, 1988). For an agitation rate of 75 rpm, the PID tuning resulted in 2.2, 216 s, and 54 s, for the gain, integral, and derivative constants, respectively. Interestingly, the gain is similar to values reported for *E. coli* cultures, whereas the integral and derivative constants were about 1 order of magnitude higher than typical bacterial cultures (Court, 1988).

To investigate if the impeller configuration chosen was enough to maintain the cells in suspension, 1 gL<sup>-1</sup> of Cytodex-1 (Pharmacia) was placed in the minibioreactor and the percentage of suspended microcarriers was measured as a function of agitation rate. As seen in Fig. 3a, 25% of the microcarriers remained settled at 75 rpm, while above 125 rpm all microcarriers were suspended. The effect of agitation rate on the mixing time ( $t_m$ ), and volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_L a$ ) is shown in Figs. 3b and 3c, respectively. It can be seen that  $t_m$  decreased from 140 s to 50 s as agitation rate increased from 25

to 125 rpm. Similarly to MRR, the  $k_L a$  linearly increased as agitation rate increased, reaching values as high as  $3.5 \text{ h}^{-1}$  at 150 rpm. These  $k_L a$  values compare very favorably with those reported for animal cell culture agitated-bioreactors in the 1- to 2-L scale range (Hu et al., 1986; Lavery and Nienow, 1987; Palomares and Ramirez, 1996). For a culture maintained at 20% DO using an  $\text{O}_2$ -enriched air source, the  $k_L a$  of  $1.8 \text{ h}^{-1}$  obtained at 75 rpm is enough to maintain a concentration of at least  $8 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$  of cells respiring at a specific rate of  $0.6 \times 10^{-10} \text{ mmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . This specific oxygen uptake rate corresponds to the maximum value obtained in this work for total nucleated cells (see below). From the results shown in Figs. 2 and 3, an agitation rate of 75 rpm was selected to perform batch cultures of HHC. Such agitation rate corresponded to an acceptable threshold value of homogeneity and dynamic characteristics of the system, but was low enough to minimize any possible damage to cells caused by excessive agitation, although this was not tested. Nevertheless, by comparing the lag phase and progenitor cells expansion data of static and bioreactor cultures, shown in the following sections, a possible hydrodynamic damage in the stirred-tank system can be discarded.

#### *On-line monitoring and control of HHC cultures*

The variables acquired on-line for a typical batch culture of HHC are shown in Fig. 4. As seen in Fig. 4a, the PID tuning constants derived from data in Fig. 2 proved to be adequate for maintaining a tight control in DO, where only very minor perturbations were observed, usually related to external factors such as sampling. DO has been shown to be a fundamental variable which can determine differentiation of progenitor cells, proliferation of colony-forming cells, and production of mature cells and progenitors of different lineages, among other effects (Bradley, et al., 1978; Koller et al., 1992; McAdams et al., 1996a). However, very few reports, as the work shown here, have performed HHC cultures at a constant DO using a feedback control algorithm. Collins et al. (1998) and Pierson et al. (1996) have previously expanded HHC and human natural killer cells, respectively, in stirred-tank bioreactors maintained at constant DO. It should be noted that most of the studies of the effect of DO are based on maintaining a gaseous overlay of various  $\text{O}_2$  concentrations and without any actual measurement of DO (Bradley, et al., 1978; Koller et al., 1992). However, this is not sufficient to maintain the DO neither at a constant nor at a predetermined value. Consequently, most literature reports can only assume that a "low" or

"high" DO exists in the HHC cultures, but the actual DO value and its variations remain unknown. Accordingly, the system presented here constitutes an important experimental tool for investigating the effect of constant DO on HHC cultures.

The inlet gas flow rates of  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$  and  $\text{CO}_2$  are shown in Fig. 4b, while the culture redox potential (CRP) and pH profiles are shown in Fig. 4c. It can be seen that during the lag phase (first 3 days) the gas composition and CRP remained relatively constant. At the fourth day, upon initiation of the exponential growth phase (see progenitor cells in Fig. 5a), the control loop automatically increased the  $\text{O}_2$  flow rate in order to maintain the DO at the desired set-point and in response to the increased oxygen demand. After reaching a maximum at 7 days of culture, the  $\text{O}_2$  flow rate decreased to 4.0% towards the end of the culture. Between days 4 and 11, accumulation of organic acids, particularly lactate, could be inferred from the decrease in  $\text{CO}_2$  flow rate as the controller acted to maintain pH at the desired set-point (see also Fig. 5c). After  $\text{CO}_2$  depletion, control in pH was lost and decreased by almost 1.0 units. Base addition at this moment should prevent such a pH drop. This important decrease emphasizes the need for pH control, such as the one used here, as most HHC cultures performed in static or non-instrumented bioreactors are maintained in a constant  $\text{CO}_2$  atmosphere and lack any type of pH control. In particular, it has been demonstrated that an optimum pH range exists for differentiation of HHC to specific lineages (McAdams et al., 1996a). Accordingly, the system presented here constitutes also an important tool for assessing the effect of pH in HHC cultures, and represents one of the few automatic feedback pH control system reported to date for such cells. It should be noted that HHC and human natural killer cells have previously been maintained at controlled pH in stirred-tank bioreactors by Collins et al. (1998) and Pierson et al. (1996), respectively. Finally,  $\text{N}_2$  flow rate changed throughout the culture to maintain a constant total gas flow rate.

The various growth phases could also be identified from changes in the CRP profile. Initiation of the exponential growth phase could be inferred from a decrease in the CRP. For the culture illustrated in Fig. 4, CRP decreased from -50 mV to -81 mV during the exponential growth phase and then increased during the death phase to a maximum of +34 mV. Similar characteristic variations in CRP and its correlation with viable cell concentration have been reported previously for hybridoma cultures at constant pH and DO (Hwang and Sinskey, 1991; Eyer and Heinzel,

1996; Higareda et al., 1997). In particular, Higareda et al. (1997) demonstrated the utility of simultaneous measurements of CRP and oxygen uptake rate (OUR) for discriminating real metabolic events from operational failures. To our knowledge, this is the first time that CRP measurements are determined, and its utility demonstrated, for a HHC culture. It should be noted that when DO and pH are maintained constant, changes in CRP solely reflect the metabolic activity of the cells. Hwang and Sinskey (1991) reported that the characteristic CRP variations could be attributed to thiol groups being excreted by animal cells. Thus, the results shown in Fig. 4c are consistent with the idea that thiol production is a generalized phenomena in mammalian cell cultures. Furthermore, as established by Nernst equation, CRP is inversely related to pH. Thus, the increase in CRP after the 11th day of culture is partially related to the decrease in pH.

In Fig. 5, growth kinetics, OUR, glucose consumption, and lactate production of the same HHC culture as the one shown in Fig. 4, are presented. The static control culture is shown in Fig. 6. Both cultures showed a long lag phase (ca. 8 days if the preincubation in T-flask is considered). Such long lag phases have also been observed by others (Sardonini and Wu, 1993). The apparent absence of a lag phase for the progenitor cells is due to the limited number of assays performed during the first 5 days of culture. Only a small increase of mononucleated cells (MNC), was observed in the bioreactor (from  $0.55 \times 10^6$  cellmL<sup>-1</sup> to  $0.7 \times 10^6$  cellmL<sup>-1</sup>) and control culture (from  $0.55 \times 10^6$  cellmL<sup>-1</sup> to  $1.01 \times 10^6$  cellmL<sup>-1</sup>). Viability remained above 98% since inoculation until the end of exponential growth phase, whereas it remained between 94% and 80% during stationary phase. During death phase, viability decreased continuously until less than 20% at the end of the culture. Although cell expansion was very low for the cultures illustrated in Figs. 4, 5, and 6, an expansion of MNC as high as 14-fold was possible in the minibioreactor system using a different cytokine combination (data not shown). Hematopoietic progenitors were determined for only a fraction of the samples. As seen in Fig 5a, progenitors concentration increased from  $3 \times 10^3$  CFUmL<sup>-1</sup> to  $18 \times 10^3$  CFUmL<sup>-1</sup> during the first 7 days of culture, and then rapidly decreased to undetectable levels towards the end of the culture. A similar behavior has been reported by Collins et al. (1997) for a variety of non-instrumented cultures of peripheral blood and umbilical cord blood. It should be noted that even though only a ca. 1.3-fold expansion in total cells was observed, a 6-fold expansion of progenitor cells was attained (Fig. 5a). Furthermore, expansion of progenitor cells in the static control

culture was only 3.6 fold (Fig. 6), i.e., lower than in the stirred-tank system. Thus, caution should be taken when evaluating the performance of a cultivation system only on the basis of total cell expansion. For instance, a total cell expansion as high as 27-fold has been reported for human bone marrow in a suspension bioreactor, but only less than 3-fold expansion of progenitor cells could be attained (Sardonini and Wu, 1993).

OUR, as determined on-line by eq. (1) from DO and inlet gas composition data, is shown in Fig. 5b. As it can be seen, OUR remained relatively constant during the first 4 days, corresponding to the lag phase of the culture. During exponential growth phase, OUR increased exponentially from 12  $\mu\text{Mh}^{-1}$  to a maximum of 42  $\mu\text{Mh}^{-1}$ , closely following the concentration of total hematopoietic progenitors. As hematopoietic progenitors concentration decreased, OUR also decreased to a final negligible value. A similar behavior of OUR with respect to the various growth phases of the culture has been previously reported by our group for hybridoma (Higareda et al., 1997) and insect cell cultures (Palomares and Ramírez, 1996). The importance of results shown in Fig. 5 are several-fold. Firstly, OUR monitoring can be used as a very convenient tool for on-line assessment of the various growth phases of the culture. In addition, OUR has been shown to be an effective tool for application of nutrient supply strategies for optimizing hybridoma and insect cell cultures (Palomares and Ramírez, 1996; Higareda et al., 1997). Accordingly, similar strategies could also be applied in HHC cultures by using OUR as the feed-back control variable. Finally, due to their close and direct correlation, OUR can be used as a simple technique for assessing hematopoietic progenitors concentration. Collins et al. (1998) have recently shown that maximum specific oxygen uptake rate closely corresponded with the maximum percentage of progenitor or colony-forming cells. It should be noted that determination of hematopoietic progenitors is performed by a time-consuming and laborious clonogenic assay (14 days). Thus, on-line and real-time estimation of hematopoietic progenitors concentration is a very valuable tool for control and optimization of HHC cultures.

Only very scarce information of OUR determinations in HHC cultures is available. For instance, Sardonini and Wu (1993) were not able to detect OUR in hollow fiber perfusion bioreactors due to the small DO differences between the inlet and outlet streams. Peng and Palsson (1996), measured OUR in a specially designed six-well plate insert. Although accurate values were measured, the dynamic method used only allowed discrete OUR determinations for a limited number of samples during the whole

culture period. Furthermore, due to the small volume of the system, each determination originated from a different well which had to be sacrificed. Similarly, Kimura et al. (1987) also determined OUR by the dynamic method from samples of a HHC line taken from a 100-mL spinner flask. Such determinations suffer from the same limitations associated to OUR measurements by the dynamic method (Higareda et al., 1997). Peng and Palsson (1996) have also determined OUR of HHC in a radial-flow parallel-plate perfusion system, but no continuous OUR data was reported. The specific OUR values, corresponding to the OUR data shown in Fig. 5 ( $0.4 \times 10^{-10}$  mmol cell<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> to  $0.6 \times 10^{-10}$  mmol cell<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>), compare very well with data reported by Collins et al. (1998) and Peng and Palsson (1996) for other HHC cultures but are 2 to 3 times lower than the values given by Kimura et al. (1987) for a permanent HHC cell line which may have altered metabolic responses. Likewise, specific OUR for HHC obtained here are 2 to 5 times lower than for other mammalian and insect cell cultures (Palomares and Ramírez, 1996; Higareda et al., 1997).

Finally, the onset of the stationary phase with respect to MNC and sharp decrease in total progenitors occurred at glucose and lactate concentrations of 3 and 0.7 gL<sup>-1</sup>, respectively (Fig. 5c), and coincided with the sudden decrease in OUR (ca. 6.8 days). Thus, such a decrease in OUR cannot be attributed to glucose limitation. Furthermore, Kimura et al. (1987) have shown that specific OUR is not affected by lactate concentrations as high as 13 gL<sup>-1</sup>. Accordingly, a possible inhibitory effect on OUR by the lactate concentrations obtained in this work can be ruled-out. The OUR behavior can therefore be indicative of another substrate or toxic by-product limiting HHC cultures at around the 7 day of culture, but this remains to be proved. Collins et al. (1997) have reported that specific lactate production rate, and thus the specific glucose consumption rate, was three orders of magnitude higher for hematopoietic progenitors than for cells that do not generate colonies. This suggests that OUR must be mainly influenced by the hematopoietic progenitors.

## Conclusions

Blood from umbilical cord represents an exceptional source of HHC for various clinical applications if a suitable *in vitro* expansion and differentiation system is available. The minibioreactor/data acquisition and control system presented here is an important experimental tool for studying cultures of HHC from umbilical cord blood, and can constitute a very attractive system

for scale-up of such cultures to a clinical stage. The main advantages of the system include an homogeneous environment and the possibility of a strict control and on-line monitoring of the various environmental variables, including pH and DO, while optimizing medium usage. In particular, characteristic variations of oxygen uptake rate and culture redox potential were determined for HHC batch cultures maintained at a constant and predetermined pH and DO values. In addition, the utility of on-line determinations of OUR and CRP was demonstrated. On-going research in our laboratory has shown that expansion of CFU-GM, total CFU, and MNC, of 10-, 9.2-, and 14-fold can be achieved in the minibioreactor system presented in this paper, which compare very favorably with other systems reported in the literature.

## Acknowledgments

Technical support by M. Martínez, A. Gómez, and N. Osorio is gratefully acknowledged. Helpful discussions with E. López-Chalini and C. Berdugo. We thank the staff from the Regional General Hospital No. 1 (IMSS) for providing umbilical cord blood samples. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant No. 102 PM, and by DGAPA IN19398 of the National University of Mexico. A.D.León acknowledges CONACyT 84201, DGAPA-UNAM and PADEP-UNAM 030527 and 202338 for financial support during his graduate studies. We are grateful to Probiomed S.A. de C.V. for donation of cytokines.

## References

- Bradley TR, Hodgson GS & Rosendaal M (1978) The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation *in vitro*. *J. Cell Physiol.* 97: 517 - 522.
- Collins PC, Papoutsakis ET & Miller WM (1996) Adaptation of hematopoietic cell culture to stirred systems. Paper 57a. American Institute of Chemical Engineers Annual Meeting, Chicago IL, USA.
- Collins PC, Nielsen LK, Wong CK, Papoutsakis ET & Miller WM (1997) Real-time method for determining the colony-forming cell content of human hematopoietic cell cultures. *Biotechnol Bioeng.* 55: 693 - 700.
- Collins PC, Nielsen LK, Patel SD, Papoutsakis ET & Miller WM (1998) Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system. *Biotechnol. Prog.* 14: 466 - 472.
- Court JR (1988) Computers in fermentation control: laboratory applications. In: Bushell ME (ed.) *Computers in Fermentation Technology. Progress in Industrial Microbiology Vol. 25* (pp. 1-45) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

- Eyer K & Heinze E (1996) On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 277-283.
- Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J & Boyse EA (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from a HLA-identical sibling. *The New England J. Med.* 321: 1174-1178.
- Higareda AE, Possani LD & Ramirez, OT (1997) The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 56: 555 - 563.
- Hu WS, Meier J & Wang DIC (1986) Use of surface aerator to improve oxygen transfer in cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 122 - 125.
- Hwang, C & Sinskey AJ (1991) The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells. In: Spier RE, Griffiths JG & Meignier B (eds.) *Production of biologicals from animal cells in culture.* (pp. 548-568). Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.
- Kimura T, Lijima S & Kobayashi T (1987) Effects of lactate and ammonium on the oxygen uptake rate of human cells. *J. Ferm. Technol.* 65: 341-344
- Kohli-Kumar M, Shahidi NT, Broxmeyer HE, Masterson M, Delaat C, Sambrano J, Morris C, Auerbach AD & Harris RE (1993) Haemopoietic stem/progenitor cell transplant in Fanconi anemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells. *British J. Haematol.* 84: 419-422.
- Koller MR, Bejder JG, Miller WM & Papoutsakis ET (1992) *Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow.* *Exp. Hematol.* 20: 264 - 270.
- Koller MR, Emerson SG & Palsson BO (1993) Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion culture. *Blood* 82: 378 - 384.
- Lavery M & Nienow AW (1987) Oxygen transfer in animal cell culture medium. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 368 - 373.
- Levec MG, Lee GM, Paek SH & Palsson BO (1994) Microencapsulated human bone marrow cultures: a potential culture system for the clonal outgrowth of hematopoietic progenitor cells. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 734 - 739.
- Mayani H, Guilbert LJ & Janowska-Wieczorek A (1990) Modulation of erythropoiesis and myelopoiesis by exogenous erythropoietin in human long-term marrow cultures. *Exp. Hematol* 18: 174 - 179.
- Mayani H, Dragowska W & Lansdorp PM (1993) Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34<sup>+</sup> cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines *Blood.* 82: 2664 - 2672.
- Mayani H, Guitierrez-Rodríguez M, Espinoza L, López-Chalini E, Huerta-Zepeda A, Flores E, Sánchez-Valle E, Luna-Bautista F, Valencia I & Ramírez OT (1998) Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem Cells.* 16: 127 - 135.
- Mayani H and Lansdorp PM (1998) Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells.* In press.
- McAdams TA, Miller WM & Papoutsakis ET (1996a) Hematopoietic cell culture therapies (Part I): cell culture considerations. *TIBTECH.* 14: 341 - 349.
- McAdams TA, Winter JN, Miller WM & Papoutsakis ET (1996b) Hematopoietic cell culture therapies (Part II). clinical aspects and applications. *TIBTECH.* 14: 388 - 396.
- Palomares LA & Ramirez OT (1996) The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnol.* 22: 225 - 237.
- Pierson BA, Europa AF, Hu WS & Miller JS (1996) Production of human natural killer cells for adoptive immunotherapy using a computer-controlled stirred-tank bioreactor. *J. Hematother.* 5: 475 - 483.
- Peng CA & Palsson BO (1996) Determination of specific oxygen uptake rates in human hematopoietic cultures and implications for bioreactor design. *Annals Biomed Eng.* 24: 373 - 381.
- Sandstrom CE, Bender JG, Miller WM & Papoutsakis, ET (1996) Development of novel perfusion chamber to retain nonadherent cells and its use for comparison of human "mobilized" peripheral blood mononuclear cell cultures with and without irradiated bone marrow stroma. *Biotechnol. Bioeng.* 50: 493 - 504.
- Sardonini CA & Wu YJ (1993) Expansion and differentiation of human hematopoietic cells from static cultures through small-scale bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 9: 131 - 137
- Saito H, Ebisawa M, Tachimoto H, Scichijo M, Fukagawa K, Matsumoto K, Likura Y, Awaji T, Tsujimoto G, Yanagida M, Uzumaki H, Takahashi G, Tsuji K & Nakahata T (1996) Selective growth of human mast cells induced by *steel* factor, Il-6, and prostaglandin E<sub>2</sub> from cord blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 157: 343 - 350.
- Zandstra PW, Eaves CJ & Piret JM (1994) Expansion of hematopoietic progenitor cell population in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells. *Biotechnol.* 12: 909 - 914.

## 5.9 Utilidad de la medición en línea de variables secundarias como la VCO y el PRC

### 5.9.1 Velocidad de Consumo de Oxígeno

La metodología para la medición de la VCO se discute en la sección 5.8. El perfil de la VCO durante los cultivos en biorreactor a 10 y 20 % OD y la expansión de progenitores se muestran en la **figura 5.22** (las cinéticas completas se muestran en la sección 5.8 y en el apéndice C). Se puede apreciar que en ambos casos, el perfil de la VCO sigue muy de cerca la cinética de crecimiento de los progenitores hematopoyéticos durante la fase de crecimiento exponencial. En la **figura 5.22a** se observa que en el cultivo a 20 % OD, la VCO y la concentración de progenitores se incrementaron de 10 a 42  $\mu\text{M}/\text{h}$  y de 3 a  $18 \times 10^3$  UFC/mL, respectivamente, mientras que en el cultivo a 10% OD, se incrementaron de 8 a 67.8  $\mu\text{M}/\text{h}$  y de 3.1 a  $33.3 \times 10^3$  UFC/mL, respectivamente. Estas diferencias en consumo y crecimiento, pueden atribuirse a que se utilizaron medios de cultivo y niveles de OD diferentes. Probablemente también influyó la variabilidad implícita al material biológico. Después del día 9, se observó un decremento en la concentración de progenitores al igual que de VCO. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Collins y col. (1998a), que reportaron que el porcentaje máximo de progenitores en los cultivos corresponde con el máximo de la velocidad de consumo de oxígeno.

Dado que los cultivos de células hematopoyéticas están constituidos por diversos tipos celulares, que pueden tener requerimientos metabólicos diferentes, se propuso un modelo multipoblacional para explicar el comportamiento de la respiración en los cultivos. La VCO en cultivos con poblaciones heterogéneas puede ser obtenido mediante la ecuación (5-10).

$$\text{VCO} = \sum_{i=1}^n (q_{\text{O}_2})_i X_i \quad (5-10)$$

donde:

VCO	= velocidad de consumo de oxígeno ( $\mu\text{M}/\text{h}$ ).
$(q_{\text{O}_2})_i$	= velocidad específica de consumo de oxígeno de la población "i" (mmol/cel.h).
$X_i$	= concentración celular de la especie "i" (cel/L).
i	= especie celular (células seminales, UFC, blastos, monocitos, granulocitos, normoblastos, etc.).

Este modelo resultante es muy complejo y difícil de evaluar, debido al gran número de tipos celulares que se generan en la hematopoyesis. Suponiendo que todas las células formadoras de colonias (CFC<sup>+</sup>), tienen la misma demanda de oxígeno, y que las células que no son capaces de generar colonias (CFC<sup>-</sup>) como los precursores y sus derivados, tienen la misma demanda de oxígeno. La ecuación (5-10) se puede reducir a un modelo de dos poblaciones que se expresa en la ecuación (5-11). Este modelo es muy sencillo de evaluar y solo se considera válido para la fase exponencial en donde los coeficientes metabólicos generalmente son constantes.

$$VCO = q_{o_2}^+ [CFC^+] + q_{o_2}^- [CFC^-] \quad (5-11)$$

donde:

$q_{o_2}^+$  = velocidad específica de consumo de oxígeno de la población CFC<sup>+</sup>.

$q_{o_2}^-$  = velocidad específica de consumo de oxígeno de la población CFC<sup>-</sup>.

[CFC<sup>+</sup>] = concentración de células formadoras de colonias.

[CFC<sup>-</sup>] = concentración de células no formadoras de colonias.

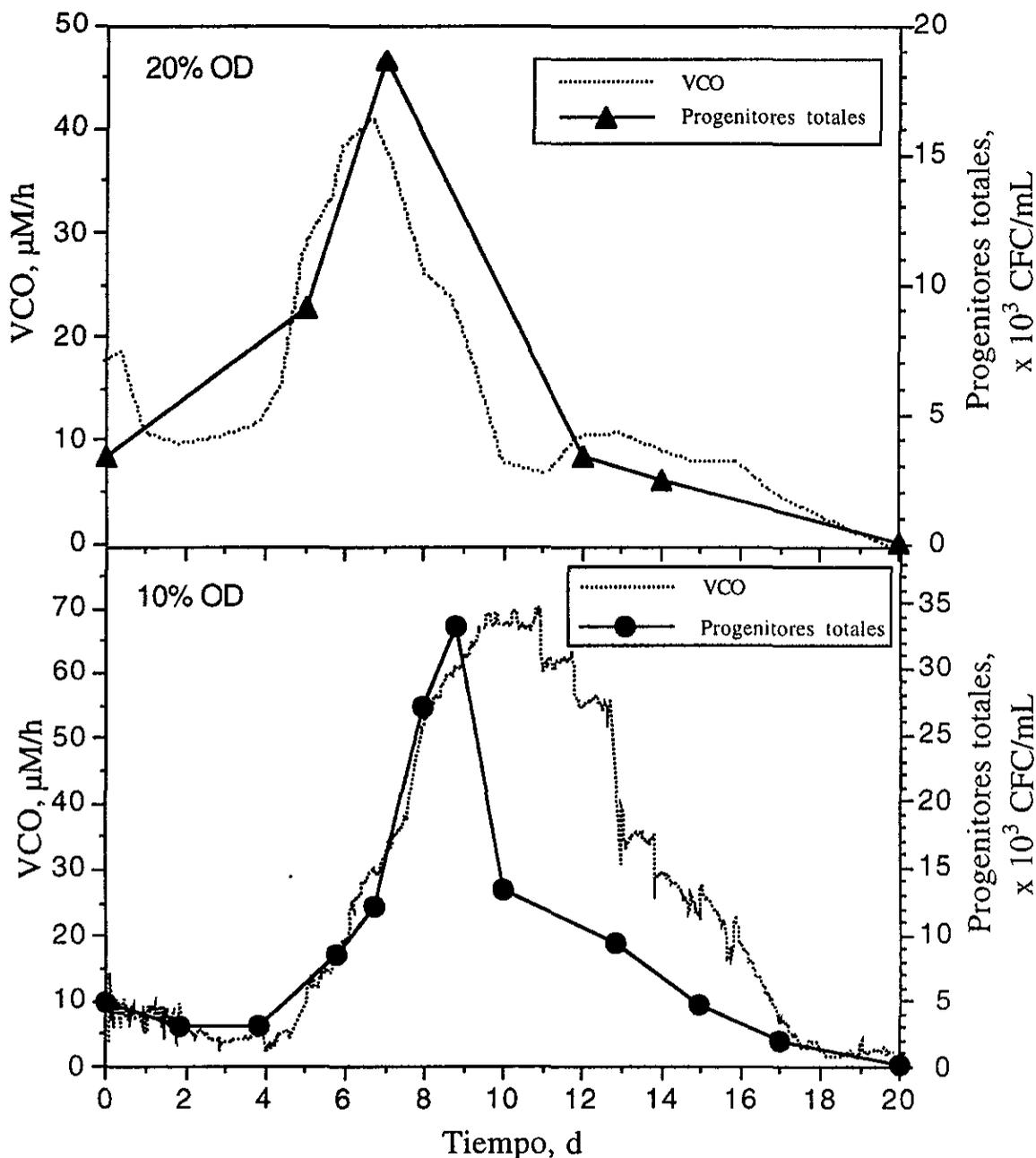
La ecuación (5-11) se puede resolver por mínimos cuadrados mediante un arreglo matricial dado por la ecuación (5-12). Donde el vector de coeficientes constantes viene dado por la ecuación (5-13).

$$\bar{\beta} = (\bar{Z}'\bar{Z})^{-1} (\bar{Z}'\bar{Y}) \quad (5-12)$$

$$\bar{\beta} = \begin{bmatrix} q_{o_2}^+ \\ q_{o_2}^- \end{bmatrix} \quad (5-13)$$

Donde Z, es la matriz de poblaciones (CFC<sup>+</sup> y CFC<sup>-</sup>), Y es el vector de la variable dependiente (VCO), Z' es la transpuesta de Z y  $\beta$  es el vector de coeficientes.

Los datos experimentales de VCO obtenidos por balance en fase líquida y la concentración de células formadoras y no formadoras de colonias, obtenidas mediante ensayos clonogénicos y con la cuenta de células en el hematocitómetro se muestran en la **tabla 5.2**.



**Figura 5.22. Perfil de VCO y cinética de crecimiento de progenitores en cultivos a OD constante.** La VCO fue obtenida por balance en fase líquida y los progenitores por ensayo clonogénico. Los medios de cultivo fueron IMDM-MTC para el cultivo a 20 % y el medio IMDM-Cit para el cultivo a 10 % OD.

Resolviendo las ecuaciones (5-12) y (5-13) se obtuvieron las velocidades específicas de consumo de oxígeno para las poblaciones  $\text{CFC}^+$  y  $\text{CFC}^-$  de  $4.13 \times 10^{-10} \text{ mmol/cel}\cdot\text{h}$  y de  $0.57 \times 10^{-10} \text{ mmol/cel}\cdot\text{h}$ , respectivamente. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) fue de 0.992. La diferencia de los valores fue de 7 veces, lo cual sugiere que los progenitores hematopoyéticos

tienen mayor actividad metabólica, que las células más diferenciadas. Esto corresponde con los resultados de Collins y col. (1997), que encontraron que la velocidad específica de generación de lactato fue de hasta 200 veces más alta para la población CFC<sup>+</sup> que para las CFC<sup>-</sup>. Van Dissel y col. (1986) reportaron una  $q_{O_2}$  de  $0.32 \times 10^{-10}$  mmol/cel·h para granulocitos humanos y de  $0.56 \times 10^{-10}$  mmol/cel·h para macrófagos de ratón. Estos valores son muy similares al valor obtenido por el modelo de dos poblaciones para las células más diferenciadas (CFC<sup>-</sup>).

Peng y Palsson (1996), reportaron  $q_{O_2}$  para células hematopoyéticas de  $0.4 \times 10^{-10}$  mmol/cel.h a  $0.6 \times 10^{-10}$  mmol/cel.h utilizando placas multipozo. El cálculo se realizó en base a células totales y utilizando el método dinámico, que es muy confiable. Estas velocidades de consumo son muy similares a la  $q_{O_2}$  obtenida para las CFC<sup>-</sup>. Debido a que la fracción de CFC<sup>+</sup> es muy pequeña respecto a la concentración de células totales, la  $q_{O_2}$  de las células con alta capacidad prolífica, puede ser enmascarada si no se hacen las consideraciones apropiadas.

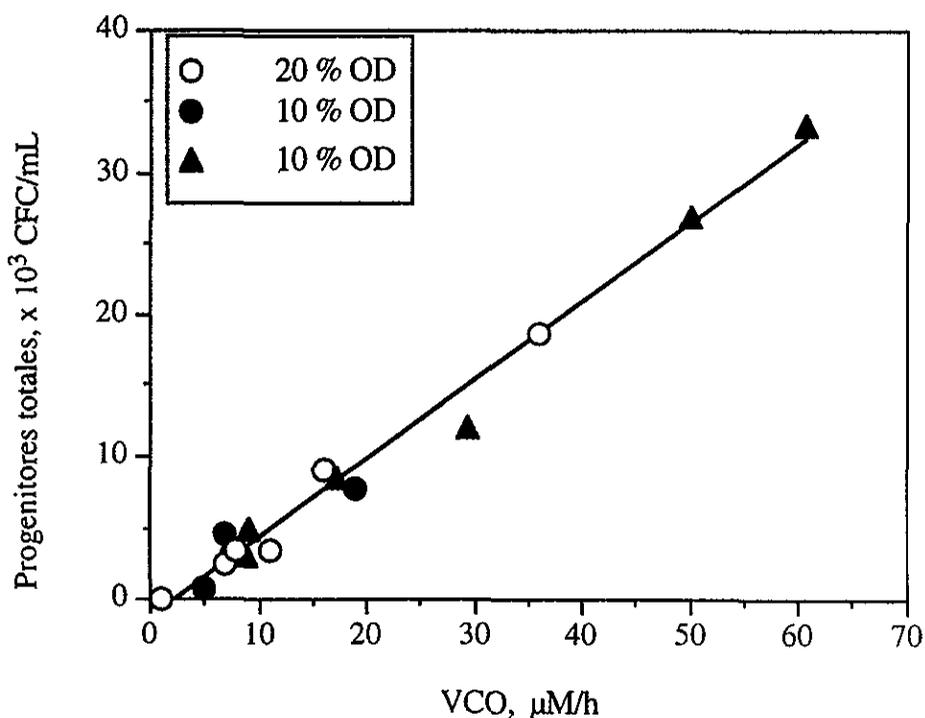
Kimura y col. (1987) determinaron la VCO en cultivos de una línea celular mielolinfocítica (RMPI 8226) por el método dinámico. Reportaron una velocidad específica de consumo de oxígeno de  $2 \times 10^{-10}$  mmol/cel.h. Este valor es 2 a 3 veces más grande que los resultados de Peng y Palsson (1996). Sin embargo, esta línea celular puede tener respuestas metabólicas alteradas por ser cancerosa.

**Tabla 5.2.** Valores experimentales de VCO y concentración de células formadoras y no formadoras de colonias. (Datos del cultivo a 10 % OD).

VCO ( $\mu\text{mol/L.h}$ )	CFC <sup>+</sup> ( $\times 10^7$ cel/L)	CFC <sup>-</sup> ( $\times 10^8$ cel/L)
9.0	0.49	0.95
8.8	0.30	1.05
7.0	0.31	1.27
17.2	0.85	2.41
29.3	1.22	4.09
50.0	2.70	6.98
60.8	3.33	8.21

La **figura 5.23** muestra los resultados de cultivos originados a partir de tres muestras de SCU diferentes, realizadas a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto y concentración de

citocinas. Se observa que existe una muy buena correlación y reproducibilidad entre la VCO y la concentración de progenitores hematopoyéticos. La correlación obtenida ( $\text{CFC} \times 10^3 = 0.552 \text{ VCO} - 1.196$   $r^2 = 0.983$ ), puede ser utilizada para la estimación de la concentración de progenitores en línea y en tiempo real, a través de mediciones de VCO. La importancia radica en que esto constituye un método rápido (minutos) para determinar la concentración de progenitores, ya que la forma tradicional como es el ensayo clonogénico requiere de al menos 14 días. También puede ser utilizada para determinar el momento en el cual la concentración de progenitores hematopoyéticos es máxima, aspecto crucial para definir el tiempo de cosecha.



**Figura 5.23. Correlación entre la VCO y la concentración de progenitores hematopoyéticos durante la fase exponencial.** Los cultivos se realizaron a 20 y 10 % OD y utilizando los medios IMDM-MTC y IMDM-Cit, respectivamente. La ecuación obtenida es  $y = 0.552x - 1.196$   $r^2 = 0.983$ .

Por otra parte, se construyó un dispositivo para medir la VCO mediante el método dinámico en muestras de volúmenes reducidos (1 mL) y fuera de línea (figura 5.24). La adquisición de datos se realizó con el sistema de cultivo descrito en la sección 4.8. El método dinámico consiste en tener una suspensión celular en un recipiente provisto de un electrodo de OD y herméticamente cerrado para evitar el contacto con alguna fase gaseosa. De tal forma, que únicamente el oxígeno disuelto presente en el medio de cultivo es utilizado por las células. Bajo

estas condiciones, la VCO viene dada por la pendiente de la concentración de oxígeno disuelto con respecto al tiempo (ecuación 5-14). Las mediciones se realizaron utilizando células mononucleares a concentraciones de 4 a  $10 \times 10^6$  cel./mL, procedentes de 4 muestras diferentes de sangre de cordón umbilical. El medio de cultivo IMDM-MTC fue enriquecido con oxígeno mediante burbujeo con una pipeta estéril antes de inocular las células.

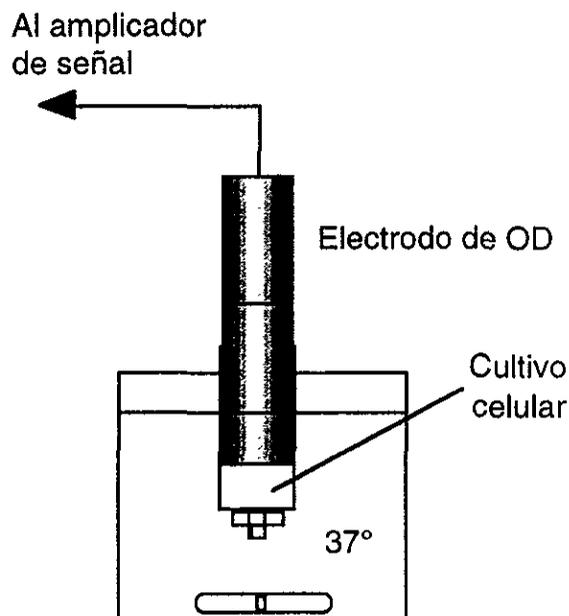


Figura 5.24. Dispositivo para medir la velocidad de consumo de oxígeno por el método dinámico.

$$VCO = -\frac{d[OD]}{dt} \quad (5-14)$$

En la **figura 5.25** se muestra el consumo de oxígeno de las células hematopoyéticas por el método dinámico, dado que no hay proceso de transferencia de oxígeno, la pendiente de la gráfica es directamente la velocidad de consumo de oxígeno (VCO). En estos ensayos, el consumo de oxígeno por el electrodo fue menor a  $3 \mu\text{M/h}$ , y como los experimentos fueron de 30 min, el consumo de oxígeno por el electrodo fue por lo tanto despreciado.

En la **tabla 5.3** se muestran los valores de VCO obtenidos en los diferentes experimentos, la concentración de progenitores obtenidos por la correlación y mediante el ensayo clonogénico.

Se observa una muy buena estimación de la concentración de progenitores, con un error inferior al 15 % y con la gran ventaja de que los resultados se obtuvieron en menos de 30 min.

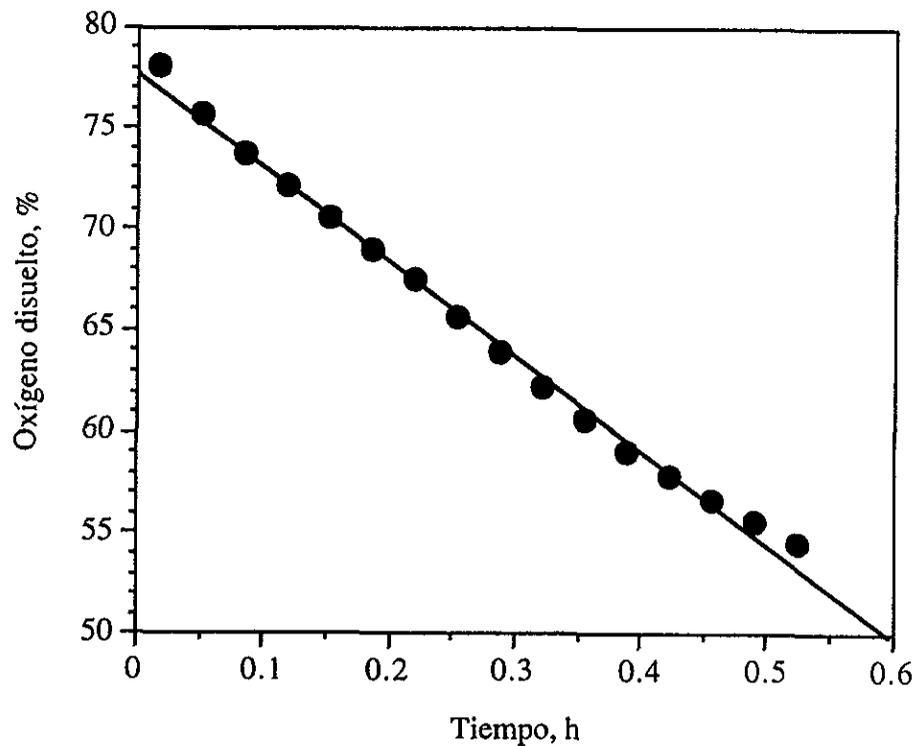


Figura 5.25. Determinación de la VCO por el método dinámico para la muestra de SCU número 1. La ecuación de la regresión es  $y = -46.555x + 77.73$   $r^2 = 0.994$ . El consumo de oxígeno por el electrodo fue menor a  $3 \mu\text{M/h}$ .

Tabla 5.3. Comparación entre la concentración de progenitores hematopoyéticos totales obtenida por el ensayo clonogénico y mediante el método de respiración. La VCO se midió por el método dinámico.

Muestra	VCO, $\mu\text{M/h}$	CFC/mL correlación	CFC/mL por el ensayo clonogénico.	% de Error
1	91	$49.0 \times 10^3$	$50.6 \times 10^3$	3.16
2	36	$17.9 \times 10^3$	$19.1 \times 10^3$	6.28
3	29	$14.8 \times 10^3$	$14.1 \times 10^3$	4.96
4	50	$26.4 \times 10^3$	$23.0 \times 10^3$	14.8

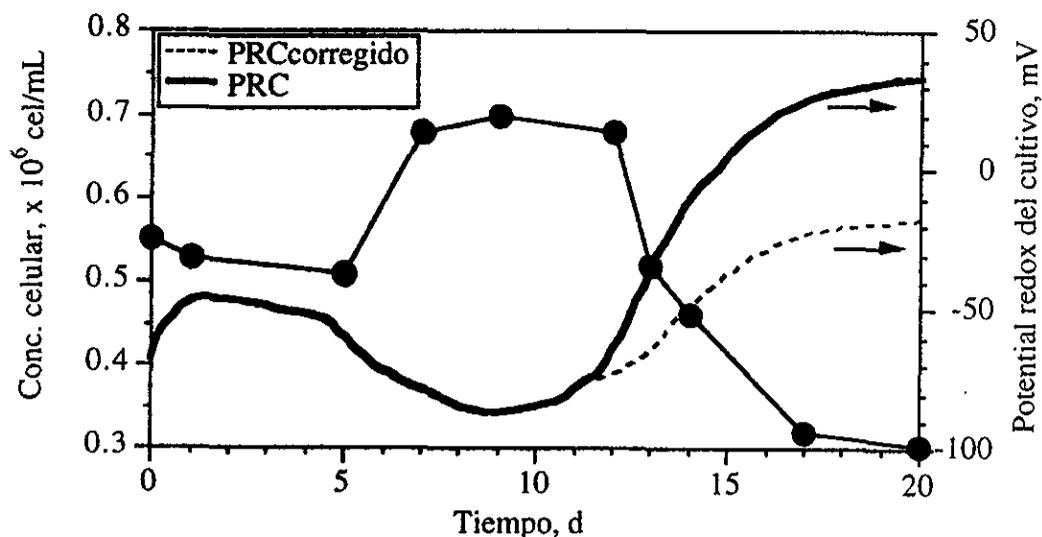
En vista de la importancia y la potencial utilidad de el método desarrollado, con el material de este apartado se pretende elaborar un artículo científico para su divulgación internacional.

### 5.9.2 Monitoreo en línea del potencial redox y su utilidad en el cultivo de células hematopoyéticas.

El potencial redox del cultivo (PRC) es una variable que ha sido muy utilizada para optimizar procesos microbianos que se realizan en bajas tensiones de oxígeno disuelto o bien en condiciones anaerobias (Thompson y Gerson 1985; Doek-Kun y col., 1998). Sin embargo, en los cultivos de células de eucariotes superiores ha sido poco estudiada y a la fecha no se ha evaluado el comportamiento del PRC en los cultivos de células hematopoyéticas. La importancia del PRC radica en que se le ha utilizado como una medida de la concentración de especies oxidantes (como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $ClO^-$ ) en los cultivos y en particular, como una medida del estrés oxidativo al que están expuestas las células. En este sentido, se ha postulado que las especies oxidantes pueden afectar los cultivos participando en el proceso de apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994; Merchetti y col., 1997; Hansson y col. 1996). Sin embargo, la apoptosis puede ser suprimida por factores de crecimiento (Williams y col. 1990, Packham y col. 1996). También, se ha reportado que mediante el uso de antioxidantes como el mercaptoetanol se puede reducir el estrés oxidativo (Ono y Alteer 1995). No obstante, se ha reportado que bajas concentraciones de especies como  $H_2O_2$  pueden mimetizar algunas actividades biológicas de los factores de crecimiento sobre algunas líneas celulares (Stevenson y col. 1994; Guyton y col. 1996). Recientemente, Finkel (1998) publicó un análisis extensivo acerca de la importancia de los radicales libres y su participación en la señalización. Broxmeyer y col. (1989b), evaluaron la expansión de UFC-GM con y sin enzimas que generan o consumen  $H_2O_2$ . Sus resultados muestran que la glucosa oxidasa y la superperóxido dismutasa -enzimas que generan  $H_2O_2$  por mecanismos diferentes- favorecieron la expansión de UFC-GM, Por el contrario, estas enzimas en combinación con catalasa (que degrada el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ ) y la peroxidasa de rábano (que cataliza la producción de  $ClO^-$  a partir de  $H_2O_2$ ) tuvieron un fuerte efecto inhibitorio sobre la generación de UFC-GM.

En la **figura 5.26** se muestra la evolución del PRC durante un cultivo de células hematopoyéticas. En general se observa que existe una relación inversa entre estas variables. Debido a un decremento en el pH después del día 11, fue necesario hacer la corrección en el PRC de acuerdo a la ecuación de Nernst (Higareda y col., 1997). Se observa que durante la fase de crecimiento ocurre una disminución del PRC y cuando las células están en fase de muerte, el PRC tiende a aumentar. La disminución del PRC se ha reportado en diversos cultivos bacterianos y de hibridomas principalmente. Thompson y Gerson (1985) y posteriormente Hwang y Sinskey, (1991), han atribuido este fenómeno a la capacidad de las células viables de

excretar al medio de cultivo toxinas u otros compuestos que afectan al PRC. Una discusión adicional se encuentra en el artículo de la sección 5.8.



**Figura 5.26. Evolución del PRC en un cultivo de células hematopoyéticas bajo condiciones controladas. Después del día 11 fue necesario realizar una corrección por pH en el PRC (PRC<sub>corregido</sub> = PRC - 61.6 ΔpH).**

EL PRC puede ser de utilidad en combinación con la VCO para discriminar eventos metabólicos como el agotamiento de glucosa y glutamina, de fallas operacionales en el cultivo de hibridomas (Higareda y col., 1997). Más comúnmente, el PRC ha sido utilizado para inferir en línea la concentración de células viables en cultivos de hibridomas. Hwang y Sinskey (1991) y posteriormente Eyer y Heinzle (1996) reportaron una ecuación semilogarítmica (ec. 5-15) que relaciona la concentración celular y el PRC bajo control de pH y oxígeno disuelto.

$$\ln [N] = a + b \text{ PRC}_{\text{corregido}} \quad (\text{ec. 5-15})$$

Donde  $a$  y  $b$  son las constantes de la regresión, el PRC<sub>corregido</sub> está dado en mV y  $N$  es la concentración celular en cel/mL. En la **figura 5.27** se muestra el ajuste de los datos obtenidos en los cultivos de células hematopoyéticas a OD y pH constante. Las constantes obtenidas se muestran en la **tabla 5.4**. Se observa que el valor de la ordenada al origen ( $a$ ) es muy similar a la reportada para cultivos de hibridomas, a excepción del valor reportado por Meneses (1999) mientras que el valor de la pendiente es 1.5 a 6 veces más pequeña que los valores típicos de los hibridomas. A diferencia de los cultivos axénicos, los cultivos de células hematopoyéticas están

constituidos por una gamma de poblaciones celulares que pueden contribuir al PRC en forma diferente.

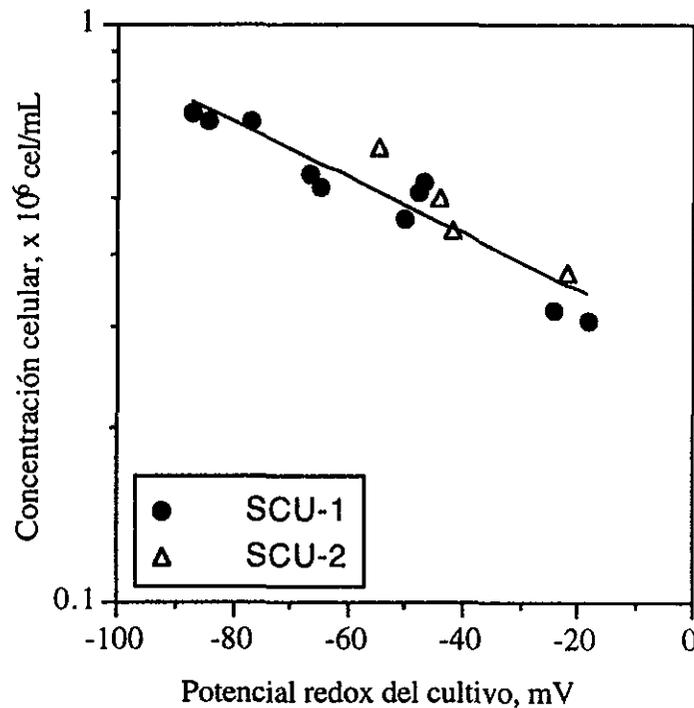


Figura 5.27. Correlación entre la concentración celular y el potencial redox del medio de cultivo. El OD se controló a 20 % respecto a la saturación del aire y pH 7.2.

Tabla 5.4. Valores reportados en la literatura de las constantes a y b.

a	b	Tipo celular	Referencias
12.86	-0.0384	Hibridomas	Hwang y Sinskey, 1991
12.30	-0.0175	Hibridomas	Eyer y Heinzle, 1996
17.36	-0.0710	Hibridomas	Meneses 1999
12.46	-0.0119	Células hematopoyéticas	Este trabajo

De igual manera que el modelo de dos poblaciones utilizado para explicar la respiración en los cultivos de células hematopoyéticas, se propone que el PRC puede ser influenciado por las poblaciones celulares denominadas como CFC<sup>+</sup> y CFC<sup>-</sup>, el modelo resultante se indica en la ecuación 5-16.

$$PRC = \varepsilon^+[CFC^+] + \varepsilon^-[CFC^-] \quad (5-16)$$

Donde  $\varepsilon^+$  y  $\varepsilon^-$  son la capacidad reductora de las células  $CFC^+$  y  $CFC^-$ , respectivamente. Los coeficientes de la ecuación fueron calculados de la misma forma que las velocidades específicas de consumo de oxígeno (secc. 5.9.1). Los valores obtenidos son:

$$\varepsilon^+ = -6.41 \times 10^{-4} \text{ mV/cel/mL}$$

$$\varepsilon^- = -0.90 \times 10^{-4} \text{ mV/cel/mL}$$

$$r^2 = 0.94$$

Se observa que la  $\varepsilon^+$  es 7 veces más grande que la  $\varepsilon^-$ , esto sugiere que las células  $CFC^+$  tienen mayor capacidad de reducir el medio de cultivo que las células  $CFC^-$ , debido a una mayor actividad metabólica de los progenitores. Esto concuerda con nuestras conclusiones respecto a la velocidad de consumo de oxígeno (secc. 5.9.1) y con el trabajo de Collins y col. (1997), que encontraron que la velocidad específica de generación de lactato fue de 1 a 3 ordenes de magnitud más alta para las células  $CFC^+$  que para las células  $CFC^-$ .

### 5.9.3 Desaparición de las citocinas en los cultivos agitados

Las citocinas son sustratos indispensables en la expansión de células hematopoyéticas. A pesar de que se han probado diferentes combinaciones de ellas, a la fecha poco se sabe cuales son los requerimientos de cada una de las citocinas. Al respecto solo se ha reportado que las células hematopoyéticas más primitivas ( $CD34^+ CD38^-$ ) utilizan más rápidamente los factores de crecimiento que las células más diferenciadas. Por ejemplo, la velocidad específica de desaparición de IL-3 y SCF fue de 25 y 100 ng/10<sup>6</sup> cel.d, respectivamente, mientras que las células que expresaban fenotipos más diferenciados (tales como células  $CD34^+ 45RA^- 71^+$  y  $CD34^+ 45RA^+ 71^-$ ) presentaron velocidades específicas de 5 a 8 veces más pequeños (Zandstra y col. 1997).

A pesar de la importancia de todas las citocinas que se utilizaron, en este trabajo, se decidió analizar únicamente IL-6 y GM-CSF. IL-6 es una citocina que actúa en las etapas tempranas de la hematopoyesis, mientras que GM-CSF tiene actividad pleiotrópica.

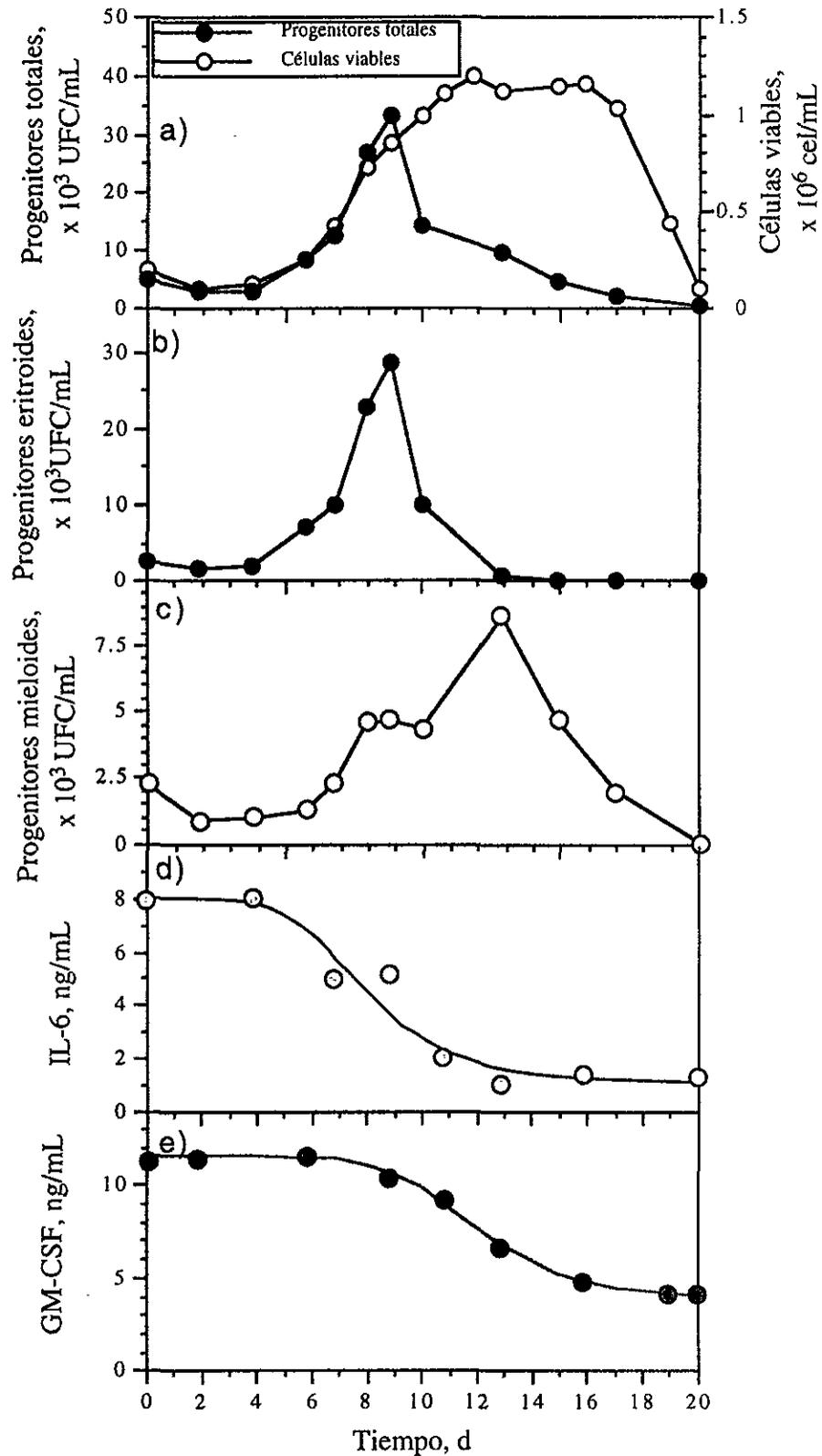
En la **figura 5.28** se muestran las cinéticas de crecimiento, expansión de progenitores y la desaparición de IL-6 y GM-CSF en un cultivo agitado y controlado. En la **figura 5.28a** se muestra la expansión de progenitores totales y la concentración de células viables. Se observa

que la expansión celular y de progenitores ocurrió en forma simultánea. Sin embargo, el máximo de los progenitores fue en el día 9 mientras la máxima concentración de células viables se presentó en el día 12. En las **figuras 5.28b y 5.28c** se muestra la cinética de expansión de los progenitores eritroides y mieloides, respectivamente. Resalta el hecho de que la mayor proporción de los progenitores hematopoyéticos son eritroides (hasta un 80%). Adicionalmente, el máximo para estas poblaciones no se presenta al mismo tiempo siendo los progenitores eritroides los que decaen más rápidamente.

Las **figuras 5.28d y 5.28e** muestran la cinética de consumo de IL-6 y GM-CSF respectivamente. No se presentaron cambios en la concentración de estas citocinas durante la etapa lag del cultivo, y el consumo de IL-6 y GM-CSF se inició a partir del día 4 y 6 respectivamente. Dado que el tiempo de vida media de las citocinas es superior a los 40 días (Zandstra y col., 1997), la descomposición espontánea de las citocinas puede ser descartada. Se observa que el consumo de IL-6 coincide con el aumento de los progenitores totales (eritroides y mieloides). Sin embargo, el punto de inflexión de la curva de IL-6 coincide únicamente con el máximo de los progenitores eritroides. Adicionalmente, la desaparición de IL-6 cesa cuando se agotaron estos progenitores.

De igual forma, el desaparición de GM-CSF se inicia cuando aumenta la concentración de progenitores mieloides (UFC-G, UFC-M y UFC-GM) y el máximo se presenta en el día 13 cuando ocurre también la inflexión de la curva de GM-CSF. Un efecto similar fue reportado por Koller y col. (1995b), quienes encontraron una buena correlación entre la cantidad de Epo utilizada y la concentración de células glyA<sup>+</sup> (eritroides), en donde se generaron 20100 a 26800 cel/U de Epo consumida.

Las velocidades específicas de desaparición de IL-6 y GM-CSF fueron de  $1.12 \times 10^{-6}$  y  $4 \times 10^{-6}$  ng/cel.h, respectivamente, al considerar únicamente los progenitores hematopoyéticos. Estos valores son comparables en magnitud con los resultados de consumo de IL-3 y SCF, para células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> reportados por Zandstra y col. (1997).



**Figura 5.28. Cinética de desaparición de las citocinas en el cultivo en biorreactor.** Se muestra también, la cinética de crecimiento de células totales y de progenitores mieloides, eritroides y totales. Los datos corresponden al cultivo a 10 % OD y medio IMDM-Cit.

## 5.10 Cultivos en frascos giratorios

Los cultivos agitados son sin duda una buena alternativa para la expansión de células hematopoyéticas en suspensión (Kim y col. 1998, Collins y col. 1998a y 1998b), no obstante el estrés hidrodinámico al que están sujetas las células es aún, una de las causas de la baja productividad de estos procesos. Por ejemplo, Collins y col. (1998b) reportaron que el cultivo de células hematopoyéticas no fue posible en frascos agitados (*spinner*) de 25 mL utilizando impulsores de barra magnética (Bellco), ni con los impulsores esféricos (Wheaton).

Los cultivos en frascos giratorios o *rollers* tienen la característica de que es posible realizar cultivos a volúmenes de hasta 300 mL y mantener a las células en suspensión a velocidades de agitación tan bajas como 1.2 rpm, donde el estrés hidrodinámico puede considerarse despreciable. No obstante, estos sistemas son difíciles de instrumentar y de controlar. En la **figura 5.29** se muestra la cinética de crecimiento de un cultivo lote de células hematopoyéticas en frascos *rollers* con 100 mL de medio IMDM-MTC y el cultivo estático tomado como referencia. Se observa que el cultivo no presentó fase lag y la concentración celular aumentó de  $0.5$  a  $1 \times 10^6$  cel/mL, mientras que el cultivo estático aumentó de  $0.5$  a  $1.1 \times 10^6$  cel/mL. Respecto a los progenitores hematopoyéticos se obtuvo una expansión de 3.5 y 3.2, respectivamente. Si bien la expansión celular y de progenitores hematopoyéticos es muy similar, la ventaja del cultivo en frascos giratorio es que se trata de un cultivo de mucho mayor volumen. Estos resultados sugieren que los cultivos en frascos giratorios son una herramienta con buen potencial para el cultivo de células hematopoyéticas en suspensión. Los cultivos en frascos giratorios al igual que los cultivos agitados, son una alternativa importante para cultivos de células hematopoyéticas en volúmenes con utilidad en la clínica.

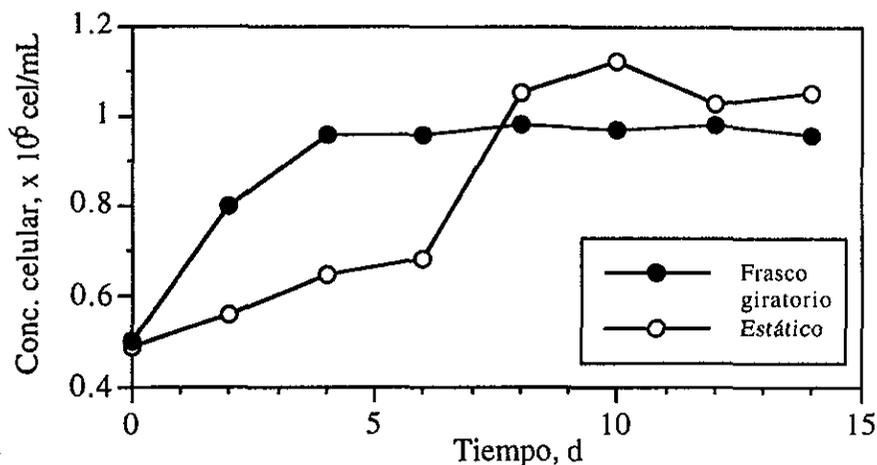


Figura 5.29. Cultivo lote de células hematopoyéticas en frasco giratorio.

## Capítulo VI

### Conclusiones y Recomendaciones

El cultivo *in vitro* de células hematopoyéticas humanas ha despertado gran interés en los últimos años, debido a la repercusión que tienen en el campo clínico. En particular, las células hematopoyéticas provenientes de la sangre de cordón umbilical –material que se consideraba como desecho biológico– hoy en día, es una de las fuentes más importantes de células hematopoyéticas. No obstante, la información sobre el cultivo *in vitro* de células hematopoyéticas, es aún escasa. Particularmente, las interacciones entre las células estromales y las células hematopoyéticas no han sido del todo esclarecidas. Por ejemplo, existen reportes contradictorios sobre el comportamiento y utilidad de los cocultivos de estroma y células hematopoyéticas, se tiene muy poca información acerca de los requerimientos nutricionales y de los comportamientos cinéticos tanto de las células estromales como hematopoyéticas.

La gran mayoría de los cultivos *in vitro* que se han reportado son realizados en condiciones estáticas y en volúmenes inferiores a 10 mL, en donde no es posible realizar estudios que nos permitan obtener mayor información de los cultivos, por ejemplo a través de la instrumentación. En este punto, los cultivos en biorreactor, son una alternativa muy importante para estos objetivos. Sin embargo, al momento la información disponible es aún más crítica.

A continuación se resaltan las conclusiones más sobresalientes de este trabajo.

#### **Cultivos de células estromales**

En el estudio cinético de las células estromales se encontró que el área disponible fue el factor limitante para el crecimiento celular y solo el consumo de Asp, Asn, Gln, Cys y Ser fue considerable, siendo Ser el único aminoácido que se agotó. Adicionalmente, se encontró que el amonio, un compuesto considerado como tóxico para muchas líneas celulares, fue consumido por las células estromales a una tasa de hasta  $6.8 \times 10^{-10}$  mmol/cel.h.

#### **Cocultivos estáticos por lote y cíclicos**

En los cocultivos estáticos de células hematopoyéticas y estroma alogénico, se encontró que por si solo el estroma no favoreció la expansión celular ni de progenitores hematopoyéticos. Cuando se utilizó medio con citocinas, no se observó efecto significativo del estroma sobre la expansión celular y de progenitores hematopoyéticos.

En los cocultivos cíclicos fue posible realizar hasta tres ciclos consecutivos de cultivo, logrando una expansión celular de  $277 \pm 170$  veces y para los progenitores hematopoyéticos de  $15 \pm 7.9$  veces.

El modelo matemático de un *pseudo*-quimiostato que se utilizó para explicar el comportamiento cinético de los cultivos a largo plazo, se ajustó muy bien a los datos experimentales reportados en la literatura. Este modelo cinético puede ser de gran utilidad para realizar un análisis racional de los cultivos, así como plantear un diseño experimental manipulando los parámetros de recambio ( $\eta$  o  $f$ ).

### **Cultivos estáticos de células hematopoyéticas**

Los cultivos de células hematopoyéticas a partir de células CD34<sup>+</sup> presentaron ventajas sobre los cultivos de células no separadas. En los cultivos de células CD34<sup>+</sup>, se eliminó el período lag; la expansión celular fue de 60 a 360 veces, mientras que en las cultivos de células no separadas fue de tan solo 3 a 5 veces. Respecto a los progenitores hematopoyéticos, la expansión fue de 3 a 6 veces para cultivos de células no separadas y de 20 a 30 veces para los cultivos con células separadas.

### **Diseño y caracterización del minibiorreactor**

En la caracterización del biorreactor se encontró que al aumentar la velocidad de agitación de 25 a 150 rpm, el  $k_L a$  y la velocidad máxima de respuesta aumentaron en forma lineal de 0.8 a 3.8 h<sup>-1</sup> y de 0.5 a 1.5 mmol O<sub>2</sub>/L.h, respectivamente. Por el contrario el tiempo de mezclado y el tiempo muerto decrecieron de 140 a 40 s y de 125 a 40 s, respectivamente. El sistema descrito, permitió la realización de cultivos agitados de células hematopoyéticas bajo condiciones controladas de pH y OD. Adicionalmente, fue posible monitorear en línea variables como el potencial redox del cultivo y la velocidad de consumo de oxígeno, situación que no se había reportado en la literatura, para cultivos de células hematopoyéticas.

### **Cultivos agitados en biorreactor y en frascos giratorios**

Los cultivos agitados en biorreactor presentaron una expansión celular ligeramente menor que los cultivos estáticos utilizados como control. Sin embargo, la expansión de progenitores hematopoyéticos fue mayor en biorreactor. La expansión de los progenitores totales, UFC-GM y de células mononucleares fue de hasta 9.2, 10 y 14 veces, respectivamente. Estos valores son comparables con los valores obtenidos en sistemas agitados reportados en la literatura. En base a los resultados obtenidos en los cultivos estáticos con células CD34<sup>+</sup>, se recomienda realizar cultivos en biorreactor utilizando este tipo de células.

Con las variables adquiridas en línea (PRC y VCO), se establecieron correlaciones para monitorear la concentración celular y de progenitores hematopoyéticos en tiempo real. Esto constituye una herramienta novedosa y potencialmente útil para determinar la concentración de progenitores hematopoyéticos en forma rápida (menos de 30 min), mientras que el método tradicional en medio semisólido requiere de al menos 14 días. La implementación puede realizarse para mediciones en línea o bien a través del método dinámico que permite determinar la VCO en muestras de volúmenes reducidos.

El modelo de dos poblaciones que se utilizó para explicar el comportamiento de la VCO y el PRC en los cultivos en biorreactor, se ajusta muy bien a los datos experimentales. Los modelos proponen que la velocidad específica de consumo de oxígeno para la población  $CFC^+$  fue 7 veces más grande que el obtenido para la población  $CFC^-$ . De igual forma, el modelo de dos poblaciones para el PRC, propone una capacidad reductora para la población  $CFC^+$  hasta 7 veces mayor que el obtenido para las células  $CFC^-$ . Esto sugiere que los progenitores hematopoyéticos tienen mayor actividad metabólica que las células más diferenciadas.

En base a los resultados obtenidos, se concluye que los cultivos en suspensión mediante biorreactores agitados y en frascos giratorios son una alternativa muy atractiva para realizar cultivos de células hematopoyéticas en volúmenes con utilidad clínica. En particular, con ayuda de la instrumentación en el biorreactor fue posible implementar un método para determinar la concentración de progenitores hematopoyéticos a través de la VCO.

El estudio de expansión de células hematopoyéticas humanas descrito en este trabajo, representa un esfuerzo pionero dentro de los grupos nacionales de investigación y constituye el primer reporte en donde se correlaciona la concentración de células hematopoyéticas con variables de proceso como la VCO y el PRC.

## Capítulo VII

### Bibliografía

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. (1994). **Cellular and molecular immunology**. Ed. Saunders. 12: 240-260.

Ardizzi, A., Guzzaloni, G., Grugni, G., Moro, D., Calo, G., Mazzilli, G., Tonelli, E., and Morabito, F. (1993). The effect of GH on erythropoiesis *in vitro*. **Minerva Endocrinol.** 18 (2): 83-85.

Berdugo, C. (1999). Desarrollo de estromas funcionales en cultivos estáticos y sobre microacarreadores para la propagación de células hematopoyéticas humanas. **Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas**. IBT-UNAM: 37-80.

Bertolini, F., Battaglia, M., Pedrazzoli, P., Da Prada, G.A., Lanza, A., Soligo, D., Caneva, L., Sarina, B., Murphy, S., Thomas, T., and Robustelli della Cuna, G. (1997). Megakaryocytic progenitors can be generated *ex vivo* and safely administered to autologous peripheral blood progenitor cells transplant recipients. **Blood** 89 (8): 2679-2688.

Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O.I., and Dich, J.E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. **Nat. Med.** 4 (9):1038-1045.

Bhatia, R., McGlave, P.B., Miller, J.S., Wissink, S., Lin, W.N., and Verfaillie, C.M. (1997). A clinically suitable *ex vivo* expansion culture system for LTC-IC and CFC using stroma-conditioned medium. **Exp. Hematol.** 25 (9):980-991.

Breems, D.A., Blokland, E.A.W., Siebel, K.E., Mayen, A.E.M., Engels, L.J.A., and Ploemacher, R.E. (1998). Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during *ex vivo* expansion of CD34<sup>+</sup> mobilized peripheral blood stem cells. **Blood** 91 (1):111-117.

Broxmeyer, H.E., Douglas, G.W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L., and Boyse, E.A. (1989a). Human umbilical cord blood as a potential source of

transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proct. Natl. Acad. Sci. USA** **86**: 3828-3832.

Broxmeyer, H.E., Cooper, S., and Gabig, T. (1989b). The effects of oxidizing species derived from molecular oxygen on the proliferation *in vitro* of human granulocyte-macrophage progenitor cells. **Ann. NY. Acad. Sci.** **554**: 177-184.

Broxmeyer, H. E., Cooper, S. L., Miller, M. E., Langefeld, C. D., and Ralph, P. (1990). Enhanced stimulation of human bone marrow macrophage colony-stimulating factor in agarose medium and at low oxygen tension. **Blood** **76** (2). 323-329.

Broxmeyer, H.E., Hangoc, G., Cooper, S., Ribeiro, R.C., Graves, V., Yoder, N.M., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L., and Rubinstein, P. (1992). Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 4109-4113.

Brugger, W., Moclin, W., Heimfeld, S., Berenson, J.R., Mertelsman, R., and Kanz L. (1993). *Ex vivo* expansion of enriched peripheral blood CD34<sup>+</sup> progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL -6, IL-3, interferon- $\gamma$ , and erythropoietin. **Blood** **81** (10): 2579-2584.

Brugger, W., M.D., Heimfeld, S., PH, D., Berenson, R.J., Mertelsmann, M.D. and Kanz, L. (1995). Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated *ex vivo*. **N. Engl. J. Med.** **333** (5): 283-287.

Buttke, T.M., and Sandstrom, P.A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunol.** **15** (1):7-10.

Cartier, N., López, J., Moullier, P., Rocchiccioli, F., Rolland, M.O., Jorge, P., Mosser, J., Mandel, J.L., Bougnères, P.F., Danos, O., and Aubourg, P. (1995). Retro viral mediated gene transfer corrects very long chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **92** (5): 1674-1678.

Collins, P.C., Nielsen, L.K., Wong, C.K., Papoutsakis, E.T., and Miller, W.M. (1997) Real-time method for determining the colony-forming cell content of human hematopoietic cell cultures. **Biotechnol. Bioeng.** **55**: 693 - 700.

Collins, P.C., Nielsen, L.K., Patel, S.D., Papoutsakis, E.T., and Miller, W.M. (1998a). Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system. **Biotechnol. Prog.** **14**: 466-472.

Collins, P.C., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (1998b). Stirred culture of peripheral cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinically relevant applications. **Biotechnol. Bioeng.** **59** (5): 534-543.

Cook, D.N. (1996). The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. **J. Leukoc. Biol.** **59** (1): 61-66.

Cowling, G.J., and Dexter, T.M. (1994). Apoptosis in the hematopoietic system. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.** **345**: 257-263.

Court, J.R. (1988). Computers in fermentation control: laboratory applications. In: Bushell, M.E. (ed.) *Computers in fermentation technology*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. **Progress in industrial Microbiology** **25**: 1-45.

Croughan, M.S., Sayre, E.S., and Wang, D.I.C. (1989). Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture. **Biotechnol. Bioeng.** **33**: 862-872.

De Sauvage, F.J., Hass, P.H., Spencer, S.D., Malloy, B.E., and Gurney, A.L., (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. **Nature.** **369**: 533-538.

De León, A., Cortés, G., Ramírez, O.T., y Galindo, E. (1995). Diseño, caracterización y aplicación de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto presentes en fermentadores de gran escala. **Avances en Ingeniería Química** **5** (1): 1-6.

De León, A. (1996). Diseño y caracterización de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto: aplicación al proceso de producción de penicilino acilasa por *E. coli* recombinante. **Tesis de Maestría en Biotecnología**. UACPyP de CCH, UNAM.: 31-36.

De León, A., Mayani, H., and Ramírez, O.T. (1998). Design, characterization, and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions. **Cytotechnol.** **28** (1-3): 127-138.

Dexter, T.M., Allen, T.D., and Lajtha, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cell *in vitro*. **J. Cell Physiol.** **91**: 335-344.

Doek-Kun, O., Sang-Yong, K., and Jung-Hoe, K. (1998). Increase of xilol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. **Biotechnol. Bioeng.** **58** (4); 440-444.

Du, X.X., Scott, D., Yang, Z.X., Cooper, R., Xiao, X.L., and Williams, D.A. (1995). Interleukin-11 Stimulates Multilineage Progenitors, but not stem cells, in murine and human long- term marrow cultures. **Blood** **86** (1): 128-134.

Dybedal, I., and Jacobsen, S.E.W. (1995). Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a potent inhibitor of erythropoiesis: neutralizing TGF- $\beta$  antibodies show erythropoietin as a potent stimulator of murine burst-forming unit erythroid colony formation in the absence of a burst-promoting aB. **Blood** **86** (3): 949-957.

Emerson, S.G. (1996). *Ex vivo* expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem Cells: The next generation of cellular therapeutics. **Blood** **87** (8): 3082-3088.

Eyer, K., and Heinzle, E. (1996) On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. **Biotechnol. Bioeng.** **49**: 277-283.

Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. **Curr. Opin. Cell Biol.** **10**: 248-253.

Furitsu, T., Saito, H., Dvorak, A.M., Schwartz, L.B., Irani, A.M., Burdick, J.F., Ishizaka, K., and Ishizaka, T. (1989). Development of human mast cells *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **86**: 10039-10043.

Gluckman, E., Broxmeyer, H.E., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Theiry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J., and Boyse, E.A. (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with

- Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA identical sibling. *N. Engl. J. Med.* **321**(17) :1174-1178.
- Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, O., and Holbrook, N.J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol.Chem.* **271**: 4138-4142.
- Hansson, M., Asea, A., Ersson, U., Hermodsson, S., and Hellstrand, K. (1996). Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J. Immunol.* **156**: 42-47.
- Haylock, D.N., Dowse, To T.L., Juttner,C.A., and Simmons, P.J. (1992). *Ex vivo* expansion and maturation of peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells into the myeloid lineage. *Blood* **80** (6): 1405-1412.
- Henschler, R., Brugger, W., Luft, T., Mertelsmann, R.F., and Kans, L. (1994). Maintenance of transplantation potential in *ex vivo* expanded CD34<sup>+</sup> selected human peripheral blood progenitor cell. *Blood* **84** (9): 2898-2903.
- Higareda, A.E., Possani, L.D., and Ramírez, O.T. (1997). The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **56**: 555 - 563.
- Highfill, J.G., Haley, S.D., and Kompala, D.S. (1996). Large-scale production of murine bone marrow cells in airlift packed bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **50**: 514-520.
- Hill, B., Rozler, O., Travis, M., Chen, S., Zannettino, A., Simmons,P., Galy, A., Chen, B., and Hoffman, R., (1996). High-level expression of a novel epitope of CD59 identifies a subset of CD34<sup>+</sup> bone marrow cells highly enriched for pluripotent stem cells. *Exp. Hematol.* **24**: 936-943.
- Hoffbrand, A.V., and Pettit, J.E. (1991). *Hematología básica*. Ed. Noriega Limusa. 17-21.
- Hoogerbrugge, P.M., Van Beusechem, V.W., Kaptein, L.C.M., Einerhand, M.P.W., and Valero, D. (1995). Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Br. Med. Bull.* **51** (1):72-81

Hossle, J.P., Grez, M., Schneider, S., Barbey, C., Rusconi, S., Schaffner, W., and Seger, R.A. (1995). Towards a genetic therapy of chronic granulomatous disease. Abstract S03-05 **Experientia** **51**. A5.

Hwang, C., and Sinskey, A.J. (1991). The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells. In: Spier RE, Griffiths JG & Meignier B (eds.) Butterworth-Heinemann, Oxford, UK. **Production of biologicals from animal cells in culture**: 48-568.

Kim, B.S. (1998). Production of human hematopoietic progenitors in a clinical-scale stirred suspension bioreactor. **Biotechnol. Lett.** **20** (6): 595-601.

Kimura, T., Lijima, S., and Kobayashi, T. (1987). Effects of lactate and ammonium on the oxygen uptake rate of human cells. **J. Ferm. Technol.** **65**: 341-344.

Knudtzon, S. (1974). *In vitro* growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. **Blood** **43**: 357-361.

Kohli-Kumar, M., Shahidi, N.T., Broxmeyer, H.E., Masterson, M., Delaat, C., Sabrano, J., Morris, C., Auerbach, A.D., and Harris, R.E. (1993). Haemopoietic stem/progenitor cells transplant in Fanconi anaemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells. **B. J. Haematol.** **85**: 419-422.

Koller, R.M., Bender, G J., Papoutsakis, E.T., and Miller, M.W. (1992). Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. **Blood** **80** (2): 403-411.

Koller, M.R., and Palsson, B.O. (1993). Tissue engineering: reconstitution of human hematopoiesis *ex vivo*. **Biotechnol. Bioeng.** **42**: 909-930.

Koller, M.R., Bander, J.G., Miller, and W.M. (1993a). Expansion of primitive human hematopoietic progenitors in a perfusion bioreactor system with IL-3, IL-6 and stem cell factor. **Bio/technol.** **11**: 358-363.

Koller, M.R., Emerson, G. S., and Palsson, O. B. (1993b). Large- scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. **Blood** **82** (2). 378-384.

Koller, M.R., Manchel, I., Maher, K.L., Armstrong, R.D., and Smith, A.K. (1998). Clinical-scale human umbilical cord blood cells expansion in a novel automated perfusion culture system. **Bone Marrow Transplant** **21** (7): 653-663.

Koller, M.R., Palsson, M.A., Manchel, L., and Palsson, B.O. (1995a). Long-term culture-initiating cell expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects. **Blood** **86** (5): 1784-1793.

Koller, M.R., Bradley, M.S., and Palsson, B.O. (1995b). Growth factor consumption and production in perfusion cultures of human bone marrow correlate with specific cell production. **Exp. Hematol.** **23**: 1275-1283.

Koller, M.R., Manchel, L., Palsson, M.A., Maher, R.J., and Palsson, B.O. (1996). Different measures of human hematopoietic cell culture performance are optimized under vastly different conditions. **Biotechnol. Bioeng.** **50** (5): 505-513.

Lakhotia, S, and Papoutsakis, E.T. (1992). Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: Experiments and modeling. **Biotechnol. Bioeng.** **39** (1): 95-107.

Lansdorp, P.M., Dragowska, W, and Mayani, H. (1993). Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. **J. Exp. Med.** **178**: 781-791.

Laskin, D.L., Heck, D.E., Punjabi, C.J., and Laskin, J.D. (1996). Role of nitric oxide in hemo-suppression and benzene-induced toxicity. **Environ. Health. Perspect.** **104** Suppl 6:1283-1287.

Leary, A.G., Wong, G.G., Clark, S.C., Smith, A.G., and Ogawa, M. (1990). Leukemia inhibitory factor differentiation-inhibiting activity/human interleukin for DA cells augments proliferation of human hematopoietic stem cells. **Blood** **75** (10): 1960-1964.

- LeBien, W.T. (1998). B-cell lymphopoiesis in mouse and man. **Curr. Op. Immunol.** 10: 188-195.
- Levee, M. G., Lee, G. M., Paek, S. H., and Palsson, B.O. (1994). Microencapsulated human bone marrow cultures: a potential culture system for the clonal outgrowth of hematopoietic progenitor cell. **Biotechnol. Bioeng.** 43: 734-739.
- López-Chalini, E, De León, A, Mayani, H, and Ramírez, OT (1998). Expansion of Hematopoietic cells in static and stirred bioreactors cultures: kinetic and metabolic aspects. **American Institute of Chemical Engineering Annual Meeting**. Paper 207a. Miami, Flo. USA.
- Luft, T., Pang, K.C., Thomas, E., Bradley, C.J., Savoia, H., Trapani, J., and Cebon, J. (1998). A serum-free culture model for studying the differentiation of human dendritic cells from adult CD34<sup>+</sup> progenitor cells. **Exp. Hematol.** 26 (6):489-500.
- Maciejewski, J.P., Selleri, C., Sato, T., Cho, H.J., Keefer, L.K., Nathan, C.F., and Young, N.S. (1995). Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **J. Clin. Invest.** 96 (2):1085-1092.
- Mayani, H., Guilbert, L.J., Janowska, and Wieczoreck, A. (1992). Biology of the hemopoietic microenvironment. **Eur. J. Haematol.** 49: 225-233.
- Mayani, H, Dragowska, and Lansdorp, P.M. (1993). Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. **Blood** 81 (12): 3252-3258.
- Mayani, H., and Lansdorp, P.M. (1994). Thy -1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. **Blood** 83 (9): 2410-2417.
- Mayani, H., and Lansdorp, P.M. (1995). Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood. **Exp. Hematol.** 23: 1453-1462.

Mayani, H., Guitiérrez, M., Espinoza, L., López-Chalini, E., Huerta, A., Flores, E., Sánchez, E., Luna, F., Valencia, I., Benitez, L., and Ramírez O.T. (1998). Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long term cultures established from umbilical cord blood cells. **Stem Cells** 16: 127 - 135.

McAdams, T.A., Winter, J.N., Miller, W.M. and Papoutsakis, E.T. (1996a). Hematopoietic cell culture therapies (part II) clinical aspects and applications. **Tibtech**. 14: 388-396.

McKenna, H.J., Vries, P., Brasel, K., Lyman, S.D., and Williams, D.E. (1995). Effect of flt3 ligand on the *ex vivo* expansion of human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. **Blood** 86 (9): 3413-3420.

Merchetti, Ph., Decaundin, D., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Susin, S.A., and Kroemer, G. (1997) Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. **Eur. J. Immunol.** 27: 289-296.

Meneses, A. (1999). El potencial de óxido-reducción: implicaciones y efectos en los cultivos de eucariotes superiores. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.

Möbest, D., Mertelsmann, R., and Henschler, R. (1998). Serum-free *ex vivo* expansion of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. **Biotechnol. Bioeng.** 60 (3): 341-347.

Nash, R., and Storb, R. (1996). Graft-versus-host effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: GVHD and GVL. **Immunol.** 8: 674-680.

Nicol, A., Nieda, M., Donaldson, C., Dennig-Kendall, P., Bradley, B., and Hows, J. (1995). Analysis of cord blood CD34<sup>+</sup> cells purified after cryopreservation. **Exp. Hematol.** 23: 1589-1594.

Ono, K., and Alter, B.P. (1995). Effects of low oxygen tension and antioxidants on human erythropoiesis *in vitro*. **Exp. Hematol.** 23: 1372-1377.

Ozturk, S. y Palsson, B. (1990). Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: Effect of media type, pH, and serum concentration. **Biotechnol. Prog.** 6: 121-128.

- Packham, G., Ashmun, R. A., and Cleveland, J. L. (1996). Cytokines suppress apoptosis independent of increases in reactive oxygen levels. **J. Immunol.** **156**: 2792-2800.
- Palomares, L.A., and Ramírez, O.T. (1996). The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. **Cytotechnol.** **22**: 225-237.
- Palomares, L.A. (1996). Caracterización cinética y metabólica de cultivos de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9): hacia el desarrollo de estrategias de control. Tesis de Maestría en Biotecnología. UACPyP del CCH, UNAM.: 29-30.
- Palsson, B. O., Paek, S. H., Schwartz, R. M., Palsson, M., Lee, G. M., and Silver, S. (1993). Expansion of human bone marrow progenitor cells in a high cell density continuous perfusion system. **Bio/technol.** **11** (3): 368-372.
- Peng, C.A., and Palsson, B.O. (1996). Determination of specific oxygen uptake rates in human hematopoietic cultures and implications for bioreactor design. **Ann. Biomed. Eng.** **24**: 373-381.
- Piacibello, W., Sanavio, F., Garetto, L., Severino, L., Bergandi, D., Ferrario, J., Fagioli, F., Berger, M., Aglietta, M. (1997). Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. **Blood** **89** (8): 2644-2653.
- Pierson, B.A., Europa, A.F., Hu, W.S., and Miller, J.S. (1996). Production of human natural killer cells for adoptive immunotherapy using a computer-controlled stirred-tank bioreactor. **J. Hematotherapy.** **5**: 475-483.
- Pipia, G.G., and Long, M.W. (1997). Human Hematopoietic progenitors cell isolation based on galactose-specific cell surface binding. **Nat. Biotechnol.** **15**: 1007-1011.
- Rameshwar, P., and Gascon, P. (1996). Induction of negative hematopoietic regulators by neurokinin -A in bone marrow stroma. **Blood** **88** (1): 98-106.
- Rameshwar, P., and Gascon, P. (1997). Hemaopoietic modulation by the tachykinins. **Acta Haematol.** **98** (2):59-64.

Ramírez, O.T., and Mutharasan, R. (1990). Cell cycle and growth phase dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. **Biotechnol. Bioeng.** **36**: 839-848.

Ramírez, O.T., and Mutharasan, R. (1992). Effect of serum on the plasma membrane fluidity of hybridomas: An insight into its shear protective mechanism. **Biotechnol. Prog.** **8**:40-50.

Rich, I.N., and Kubanek, B. (1982). The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells *in vitro*. **B. J. Haematol.** **52**: 579-588.

Roy, V. and Verfaillie, C.M. (1997). Soluble factor(s) produced by adult bone marrow stroma inhibit *in vitro* proliferation and differentiation of fetal liver BFU-E by inducing apoptosis. **J. Clin. Invest.** **100** (4): 912-920.

Sachs, D.H. (1996). Transplantation. **Immunol.** **8**: 671-673.

Saito, H., Ebisawa, M., Tachimoto, H., Shicchijo, M., Fukagawa, K., Matsumoto, K., Likura, Y., Awaji, T., Tsujimoto, G., Yanagida, M., Uzumaki, H., Takahashi, G., Tsuji, K., and Nakahata, T. (1996). Selective growth of human mast cells induced by steel factor il-6, and prostaglandin e<sub>2</sub> from cord blood mononuclear cell. **J. Immunol.** **157**: 343-350.

Sando, G.N., and Rosenbaum, L.M. (1985). Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase:purification and properties of the form secreted by fibroblasts in microcarrier culture. **J. Biol. Chem.** **260** (28): 15186-15193.

Sandstrom, C.E., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (1994). Review: serum-free media for cultures of primitive and mature hematopoietic cells. **Biotechnol. Bioeng.** **43**: 706-733.

Sandstrom, E.C., Bender, J.G., Miller, W.W. and Papoutsakis, E.T. (1996). Development of novel perfusion chamber to retain nonadherent cells and its use for comparison of human "mobilized" peripheral blood mononuclear cell cultures with and without irradiated bone marrow stroma. **Biotechnol. Bioeng.** **50** (5): 493-504.

Sardonini, C.A., and Wu, Y.J. (1993). Expansion and differentiation of human hematopoietic cells from static cultures through small-scale bioreactors. **Biotechnol. Prog.** **9**: 131 - 137.

- Selleri, C., Sato, T., Raiola, A.M., Rotoli, B., Young, N.S., and Maciejewski, J.P. (1997). Induction of nitric oxide synthase is involved in the mechanism of Fas-mediated apoptosis in haemopoietic cells. **Br. J. Haematol.** **99** (3):481-489.
- Stevenson, M.A., Pollock, S.S., Coleman, C.N., and Calderwood, S.K. (1994). X-irradiation, phorbol esters, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NiH-3T3 cells through the formation of oxygen intermediates. **Cancer Res.** **54**: 12-15.
- Thomas, R., and Lipsky, P.E. (1996). Dendritic cells: origin and differentiation. **Stem Cells** **14** (2):196-206.
- Thompson, C. (1995). *Umbilical Cords: Turning Garbage Into Clinical Gold*. **Science** **268**: 805-807.
- Thompson, B.G., and Gerson D.F. (1985). Electrochemical control of redox potential in batch cultures of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.** **27**: 1512-1515.
- To, L.B., Haylock, D.N., Simmons, P.J., and Juttner, C.A. (1997). The biology and clinical uses of blood stem cells. **Blood** **89** (7): 2233-2258.
- Touraine, J.L. (1992). Rationale and results of in utero transplants of stem cells in humans. **Bone Marrow Transplant.** **10** (1): 121-126.
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu. Rev. Immunol.** **13**: 251-271.
- Valerio, G., Di Maio, S., Salerno, M., Argenziano, A., Badolato, R., and Tenore, A. (1997). Assessment of red blood cell indices in growth-hormone-treated children. **Horm. Res.** **47** (2): 62-66.
- Van Diessel, J.T., Oliever, K.N., Leijh, P.C.J., and Van Furt, R. (1986). A reaction vessel for the measurement of oxygen consumption by small number of cells in suspension. **J. Immunol. Methods** **92** (2):271-280.

Van Ranst, P.C., Snoeck, H.W., Lardon, F., Lenjou, M., Nijs, G., Weekx, S.F., Rodrigus, I., Berneman, Z.N., and Van Bockstaele, D.R. (1996). TGF-beta and MIP-1 alpha exert their main inhibitory activity on very primitive CD34<sup>++</sup>CD38<sup>-</sup> cells but show opposite effects on more mature CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> human hematopoietic progenitors. **Exp. Hematol.** **24** (13): 1509-1515.

Verfaillie, C.M. (1992). Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term *in vitro* hematopoiesis. **Blood** **79**: 2821-2826.

Verfaillie, C.M. (1993). Soluble factors produced by human bone marrow stroma increase cytokine induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. **Blood** **82** (7): 2045-2053.

Verfaillie, C.M. and Catanzaro, P. (1996). Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells. **Leukemia** **10**: 498-504.

Wagner, J.E., Broxmeyer, H.E., Byrd, R.L., Zehnbauser, B., Schmeckpeper, B., Shah, N., Griffin, C., Emanuel, P.D., Zuckerman, K.S., Cooper, S., Carow, C., Bias, W., and Santos, G.W. (1992). Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. **Blood** **79**: 1874-1881.

Weekx, S.F., Van Bockstaele, D.R., Plum, J., Moulijn, A., Rodrigus, I., Lardon, F., De Smedt, M., Nijs, G., Lenjou, M., Loquet, P., Berneman, Z.N., and Snoeck, H.M. (1998). CD34<sup>++</sup> CD38<sup>-</sup> and CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source. **Exp. Hematol.** **26** (11): 1034-1042.

Williams, G.T., Smith, A., Spooncer, E., Dexter, T.M., and Taylor, D.R. (1990). Hemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. **Nature** **343**: 76-79.

Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Ogawa, M., Leary, A.N., Kearney, J., and Buck, D.W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood** **90** (12): 5002-5012.

Zandstra, P.W., Eaves, C.J., and Piret, J.M. (1994). Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactor of normal human bone marrow cell. **Bio/technol.** 12: 909-914.

Zandstra, P.W., Petzer, A.L., Eaves, C.J., and Piret, J.M. (1997). Cellular determinants affecting the rate of cytokine depletion in cultures of human hematopoietic cells. **Biotechnol. Bioeng.** 54 (1): 58-66.

Zannettino, A.C.W., Bühring, H.J., Niutta, S., Watt, S.M., Benton, M.A., and Simmons P.J. (1998). The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. **Blood** 98 (2):2613-2628.

# Capítulo VIII

## Apéndices

### A. Cocultivos de células estromales y células hematopoyéticas de SCU

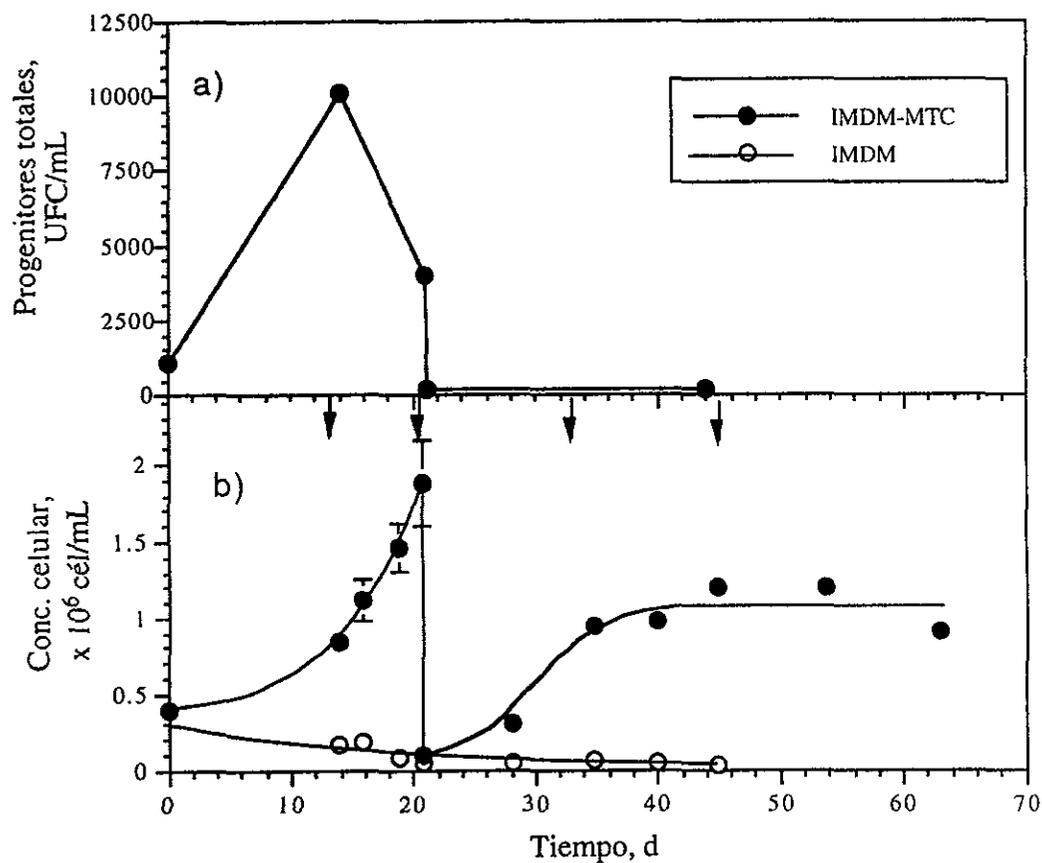


Figura A.1. Cocultivo de células hematopoyéticas en estroma de médula ósea humana. (↓) indica recambio de medio de cultivo. Los símbolos indican el promedio de dos pozos y las barras indican la desviación estandar.

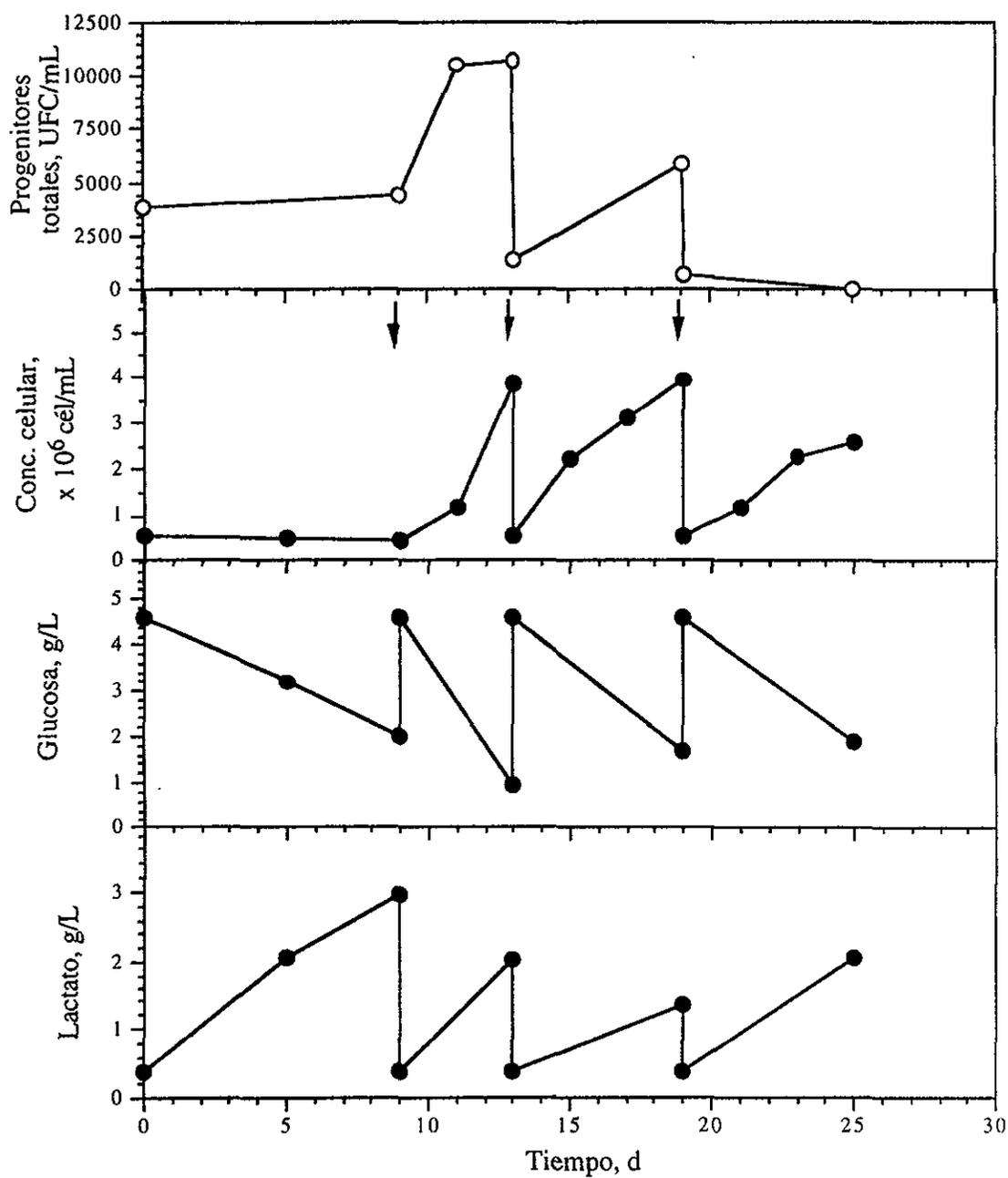


Figura A.2. Cocultivo de células hematopoyéticas con estroma de médula ósea. (↓) indica recambio de medio de cultivo.

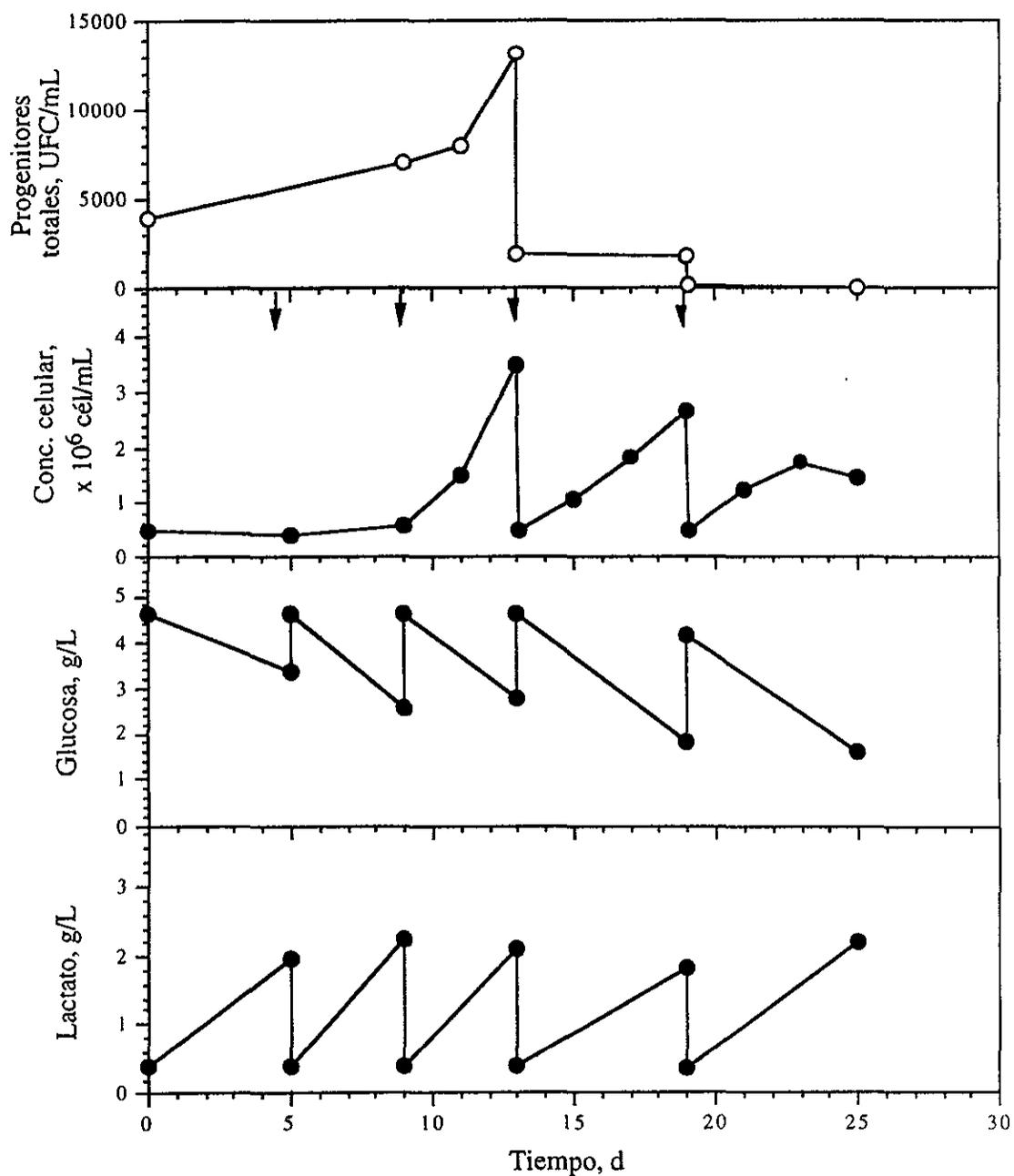


Figura A.3. Cocultivo de células hematopoyéticas en estroma híbrido (↓) indica recambio de medio de cultivo. El estroma híbrido fue proporcionado por C. Berdugo, descritos en Berdugo (1999).

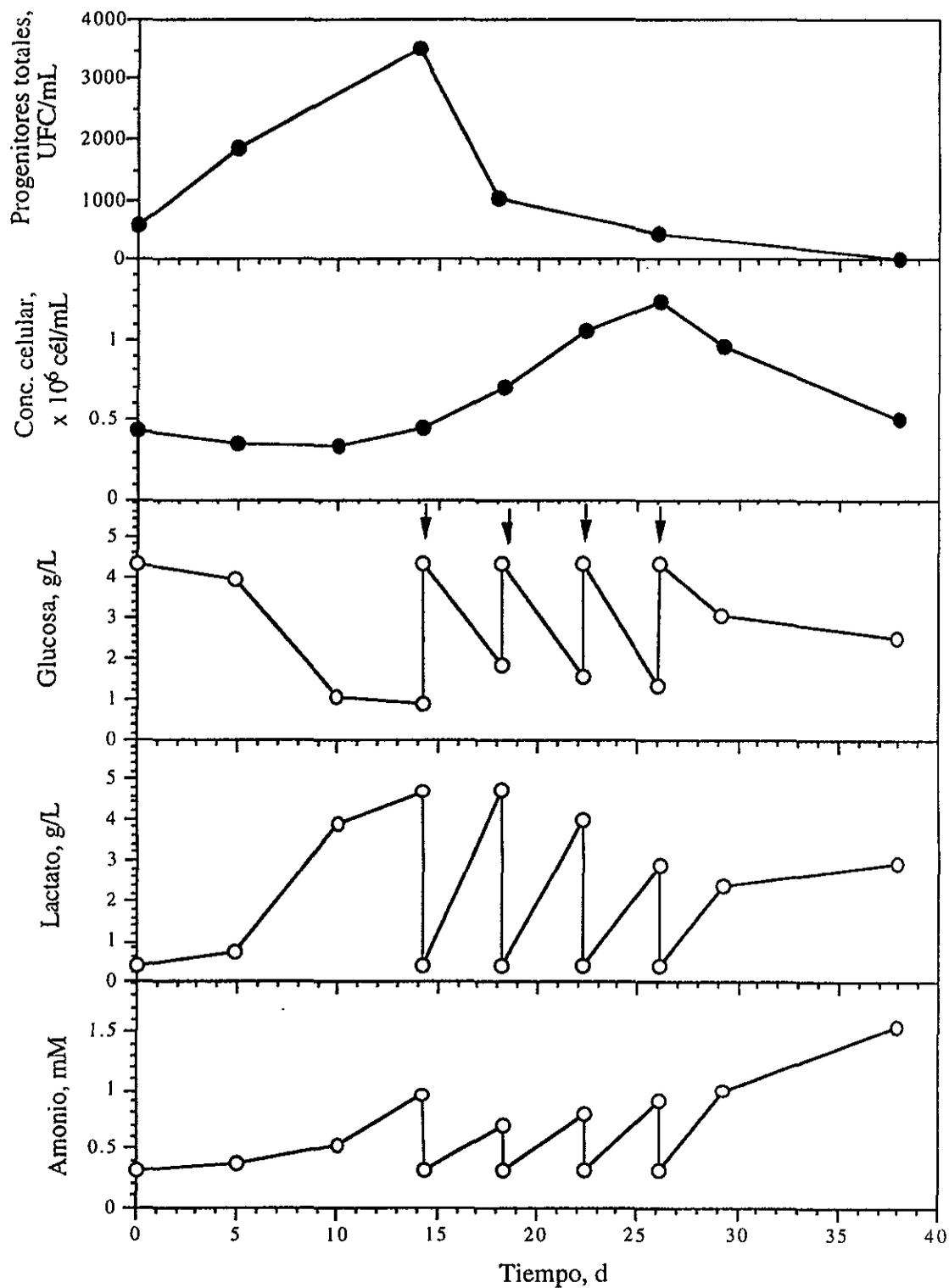


Figura A.4. Cocultivo de células hematopoyéticas y estroma híbrido (↓) indica recambio de medio de cultivo. El estroma híbrido fue proporcionado por C. Berdugo, descritos en Berdugo (1999).



### C. Cultivo en biorreactor

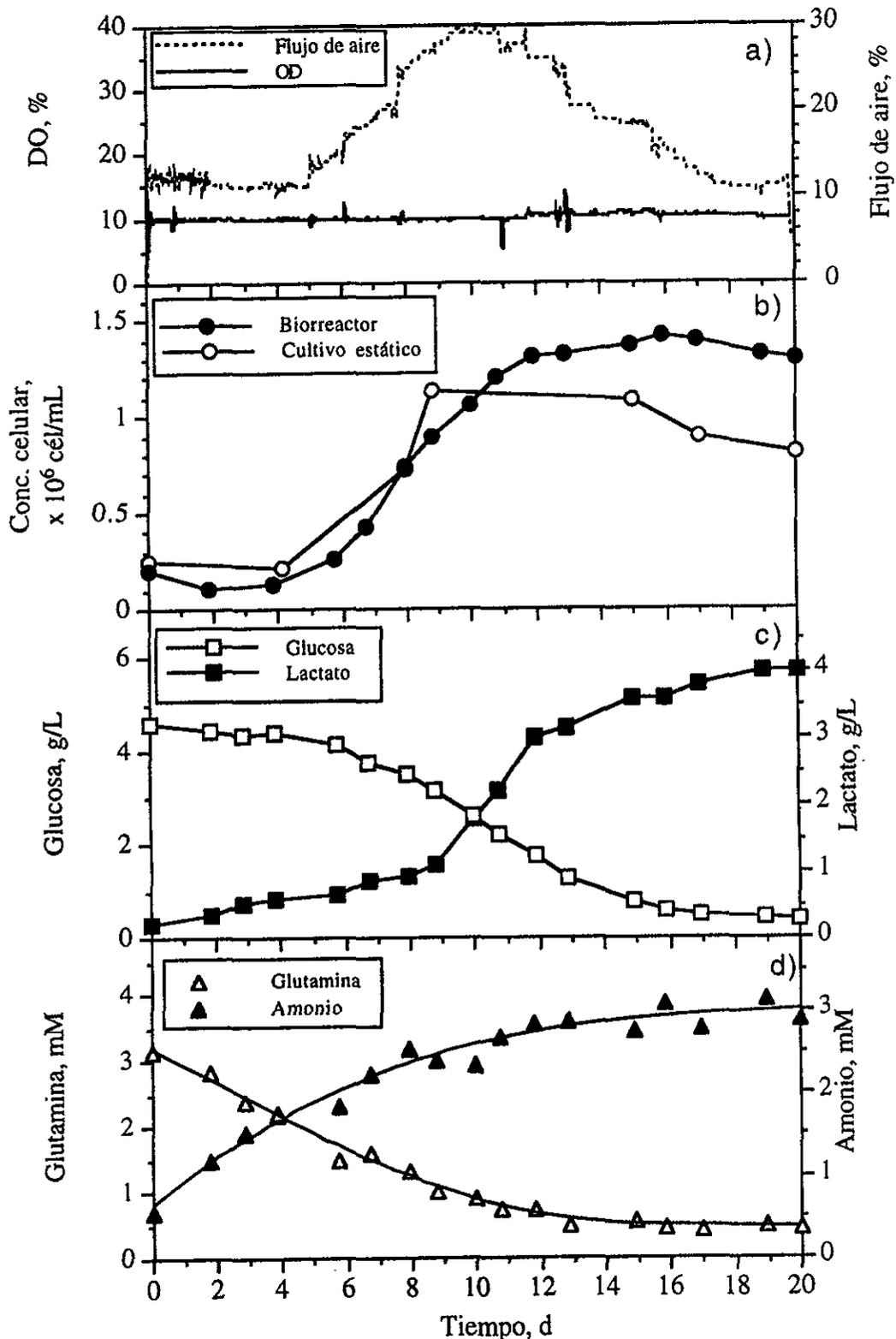


Figura C. 1. Cultivo por lote de células hematopoyéticas a 10 % OD y medio IMDM-cit en biorreactor. Las cinéticas son para el cultivo en biorreactor y solo se incluye la concentración celular para el cultivo estático.