

Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas)

NATHALY CÁRDENAS BELTRÁN

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

**Bogotá, D.C., Colombia
Junio de 2013**

Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas)

NATHALY CÁRDENAS BELTRÁN

APROBADO

Raúl A. Poutou-Piñales, Ph.D.

Director

Ismael Samudio, Ph.D.

Codirector

Ivonne Gutiérrez Rojas, Bact., M.Sc., Cand. Ph.D.

Jurado

Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas)

NATHALY CÁRDENAS BELTRÁN

Ingrid Schuler García, Ph.D.

Decana Académica Facultad Ciencias

Janeth Arias Palacios, M.Sc., M.Ed.

Directora Carrera Microbiología

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y justicia”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

TABLA DE CONTENIDO

Página

Resumen.....	6
Introducción.....	7
Justificación.....	9
Marco Teórico.....	10
Objetivos.....	19
Metodología.....	20
Resultados y Discusión.....	22
Conclusiones.....	40
Bibliografía.....	41

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue determinar mediante revisión bibliográfica las condiciones adecuadas para el cultivo de células eucariotas superiores (humanas) en biorreactores. Para poder cumplir este objetivo se seleccionaron 45 artículos científicos; lo que permitió obtener información como, el tipo de célula a cultivar, el tipo de biorreactor adecuado para cada célula, el medio de cultivo y los factores que se deben controlar como, el oxígeno disuelto, dióxido de carbono, la agitación, el pH, la temperatura y por ultimo determinar la cinética de crecimiento de cada célula.

Se encontró que las células eucariotas superiores (humanas) se pueden tomar de una pequeña porción inicial de tejido del donante como una fuente de células o por medio de células madre multipotenciales, que se obtienen a partir de hígado fetal, sangre de cordón umbilical, médula ósea y del tejido adiposo.

Las células de huesos y cartílagos se cultivan en biorreactores de fibra hueca, pared giratoria y de perfusión de paredes rotatorias (RPWV). Las células sanguíneas se cultivan en biorreactores de tanque agitado y los fibroblastos en cualquiera de los 4. Estas células deben estar en agitación constante entre 15-30rpm, para evitar problemas de daño celular , además el pH se debe mantener en $7,4 \pm 0,2$ y la temperatura entre 25 y 37 °C.

Palabras clave: cultivo, biorreactor, células eucariotas superiores (humanas).

1.0. Introducción

Se ha estudiado que el cultivo de células eucariotas se puede desarrollar en biorreactores, los cuales son equipos donde ocurren procesos bioquímicos y biológicos en condiciones monitoreadas y controladas. Estas características, hacen que las células encuentren en muchas ocasiones sus condiciones naturales de crecimiento y desarrollo. El uso de biorreactores para cultivar células eucariotas superiores (humanas) en condiciones dinámicas beneficia varios procesos como el intercambio de masa, la transferencia de nutrientes, el control de diferentes factores como el pH, la agitación, la presión, la temperatura, el tipo de mezclado, entre otros (Korossis et al., 2005, Martin et al., 2010).

Tradicionalmente, la producción de células eucariotas superiores se lleva a cabo en pequeños frascos o cajas de cultivo que actúan como biorreactores estáticos. Estos desde principios del año 2000, han empezado a ser reemplazados por biorreactores que proporcionan un ambiente de cultivo dinámico y que exhiben además, mayor volumen disponible para el crecimiento (Arévalo et al., 2005; Portner et al., 2005).

Existen varios tipos de biorreactores que se han estudiado para el cultivo de células eucariotas, entre los que encontramos biorreactores de tanque agitado, denominados Spinner, en los que el medio es movilizadado por un agitador magnético localizado en la base del biorreactor (Arévalo et al., 2005). Otro ejemplo es el biorreactor de perfusión de paredes rotatorias (RWPV), diseñado originalmente por la NASA. En este biorreactor las células se mueven en un fluido con bajo nivel de esfuerzos cortantes y adecuado abastecimiento de oxígeno y nutrientes. Consta de un contenedor formado por dos cilindros concéntricos y un disco plano que se encuentra unido a uno de los extremos del cilindro interior. Entre el disco y la pared del contenedor existe un pequeño espacio por donde el fluido con oxígeno y nutrientes es introducido al biorreactor. El cilindro interior y el disco pueden girar a diferente velocidad del cilindro exterior. Los agregados de células se mueven en la región comprendida entre los dos cilindros (Portner et al., 2005).

Otro tipo de sistemas dinámicos son los biorreactores de fibras huecas. El sistema consiste en un recipiente cerrado en el cual se inserta un haz de fibras huecas semipermeables, entre las cuales se ponen las células. Por dentro de estas fibras se realiza la circulación del medio de cultivo que provee nutrientes a las células y permite la eliminación de desechos y residuos del metabolismo celular (Portner et al., 2005).

Por otro lado, existe el biorreactor de paredes giratorias, el cual es uno de los sistemas dinámicos más novedosos. Está constituido por dos cilindros concéntricos que rotan a una velocidad de 15 a 30 rpm; estos cilindros pueden rotar de forma separada. Las células primero se siembran en mini-soportes (microcarriers) que se colocan en el espacio localizado entre los dos cilindros del biorreactor, donde quedan suspendidos en el medio (Martin et al., 2005).

En la actualidad, los cultivos de células eucariotas superiores (humanas) han constituido una alternativa cuando no hay una fuente disponible de tejido natural o de células en pacientes que han perdido parte de la piel, mucosas o tienen carencia en alguna célula importante en el cuerpo, como células de hueso o cartílago y su única opción son los injertos. Los cultivos desarrollados empleando células autólogas no producen rechazo inmunológico y no generan morbilidad debido a que la cantidad de tejido que se toma para extraer las células es mínima (Ye et al., 2006).

Además, el cultivo de células sirve para producir productos proteicos, para multiplicar vectores virales para terapia génica y como sustratos para estudios farmacológicos y toxicológicos, con el fin de dejar de usar animales para este tipo de estudios (Lichtenberg et al., 2005).

Es por esto la importancia de realizar un trabajo, en el cual se recopile la información de cómo realizar cultivos de células eucariotas superiores (humanas) en biorreactores, que nos permita entender la diferencia con los cultivos en cajas de petri o fracos y así poder llegar a aumentar el volumen de producción de las células eucariotas superiores (humanas), mejorando las condiciones normales de crecimiento y obteniendo óptimos resultados para poderlos aplicar en las áreas de medicina, farmacia, investigación, entre otras.

2.0. Justificación

El propósito de implementar la producción de células eucariotas superiores a una mayor escala, tiene varios objetivos en la actualidad, dentro de los que encontramos:

Procesamiento de productos proteicos.

Producción de vectores virales para la terapia génica (la inserción de un gen normal en las células somáticas que contienen un gen defectuoso para curar la enfermedad causada por ese defecto). Los principales objetivos de esta terapia incluyen Cáncer, VIH, Artritis, enfermedades cardiovasculares y enfermedades del Sistema Nervioso Central y la Fibrosis Quística.

Producción de células eucariotas para uso como sustratos “*in Vitro*” en los estudios farmacológicos y toxicológicos.

Y la ingeniería de tejidos o la organogénesis para la producción de dispositivos de reemplazo ó asistencia de órganos bio-artificiales; por ejemplo, piel artificial para personas que han sufrido de quemaduras graves, dispositivos de asistencia hepática para personas con insuficiencia hepática o islotes pancreáticos para personas con diabetes (Granet et al., 1998).

Por esto la importancia de realizar este trabajo, en el cual se pretende por medio de una revisión bibliográfica determinar las condiciones adecuadas, el mejor tipo de biorreactor, los factores que se deben monitorear y el modelo de análisis de la cinética de crecimiento de este tipo de células.

3.0. Marco Teórico

Las células eucariotas superiores son la unidad anatómica y funcional de los seres vivos, con capacidad para crecer, relacionarse con el medio externo, reproducirse y transmitir información a las demás células de su alrededor. A diferencia de las células procariontas, las células eucariotas poseen una membrana nuclear que encierra a un núcleo, en cuyo interior se localiza el material genético. Además, dentro del citoplasma tienen numerosos organelos que cumplen funciones específicas tales como las mitocondrias, retículos endoplasmáticos liso y granular, aparato de Golgi, lisosomas, ribosomas, centríolos, vacuolas, microtúbulos y microfilamentos. Las células eucariotas superiores (humanas) son más evolucionadas y de estructura más compleja que las procariontas, se estima que son diez veces más grande y se diferencia de las células vegetales y las animales (Balin et al., 2002).

El cultivo de células, tiene su origen en el siglo XIX, cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vasos de vidrio (Spector 2007).

Durante la segunda mitad del siglo XX hubo un gran esfuerzo por desarrollar medios y prácticas de cultivos para producir cultivos celulares viables y proliferativos a partir de una gran variedad de organismos tales como mamíferos (humanos). Se han obtenido líneas celulares específicas a partir de órganos humanos como el hígado, riñón, pulmón, nódulos linfáticos, corazón y ovario, junto con un amplio rango de líneas de células cancerígenas (Ramírez 2007).

En un principio, el objetivo era el estudio de las células, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuándo dejan de crecer. Este tipo de estudios todavía tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de las células tumorales y la modulación de la expresión genética (Frahm et al., 2002).

Otra área de gran interés se centra en la biología del desarrollo. Los esfuerzos para explicar cómo el gran número de células presentes en el organismo maduro derivan de una sola célula a partir de la fertilización, han llevado a la búsqueda de modelos experimentales. El cultivo celular es muy adecuado como modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación, por lo que las líneas celulares que conservan la capacidad de diferenciarse “*in vitro*” son objeto de un intenso estudio (Morgan et al., 1995).

Hay cierto tipo de investigaciones que sencillamente no pueden realizarse sin el cultivo de células, por ejemplo, el trabajo con animales transgénicos, conducente a que organismos maduros expresen genes nuevos, se basa totalmente en las técnicas de cultivo celular para la inserción de genes extraños en las células receptoras. Tanto la tecnología de la fusión celular como los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular que, en cierto modo, han sido diseñadas para sustituir a la metodología “*in vivo*” (Erazo et al., 2001).

Las células eucariotas, se han cultivado y se siguen cultivando en general, dentro de recipientes de vidrio o plástico, como placas de Petri o frascos de Roux (Figura 1), en medios de cultivo que contienen una serie de moléculas como sales, glucosa, aminoácido y vitaminas como nutrientes, a 37°C y en condiciones apropiadas de humedad y oxigenación, así como de esterilidad (Martin 2004).



Figura 1. Fotos de cajas de petri y frascos Roux para el cultivo de células eucariotas en condiciones estáticas. Tomado de:

<http://centros.edu.xunta.es/iesastelleiras/depart/bioxeo/lgazon/presen/bac2/bio/pdf/micros.pdf>

Estas condiciones estáticas, han generado varios problemas para el crecimiento de las células, ya que la transferencia de oxígeno y nutrientes, principalmente, se ve afectada entre las capas de células que se pueden formar. Otro gran problema, es el tamaño de los cultivos, que tienen limitación de crecimiento (Pérez et al., 2001).

En su ambiente natural, las células eucariotas superiores obtienen los nutrientes esenciales para su metabolismo y crecimiento a través del torrente sanguíneo. Imitar la complejidad del aporte sanguíneo ha sido un área de continuo estudio, ya que los problemas de los cultivos estáticos están en que no existe dinamismo que permita un buen desarrollo de las células (Spector 2007).

El cultivo de células eucariotas superiores en biorreactores ha generado ciertas dinámicas favorables para las células, lo que ha permitido que estas se encuentren en sus condiciones normales de crecimiento y así se ha visto beneficiado (Ramírez 2007).

Un biorreactor, es un recipiente comúnmente cilíndrico que puede variar en tamaño, desde unos milímetros hasta metros cúbicos, donde se pretende mantener ciertas condiciones ambientales como el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno, entre otras, dentro de procesos químicos o biológicos (Frahm et al., 2002).

Comercialmente los biorreactores que se utilizan para cultivar células eucariotas superiores (células humanas) son modificaciones de reactores utilizados para la fermentación de células procariontas (bacterias). Sin embargo, las células eucariotas superiores son más frágiles a los esfuerzos cortantes que las procariontas ya que están

rodeadas por una membrana frágil que puede dañarse por colisiones con las paredes del biorreactor o por los esfuerzos cortantes que se generan en el fluido. Además, el tipo de células eucariota requieren una superficie sólida en donde se puedan reproducir, y finalmente se requiere abastecer continuamente de oxígeno y nutrientes a las células, además de eliminar los desechos para satisfacer los requerimientos bioquímicos de éstas células, razón por la cual se han diseñado nuevos biorreactores con la finalidad de proporcionar un ambiente adecuado para el cultivo de estas células (Morgan et al., 1995).

Un ejemplo de biorreactor para el cultivo de células eucariotas superiores (humanas) es el **perfusión de paredes rotatorias (RWPV)**, diseñado originalmente por la NASA para cultivar en el espacio células humanas cancerosas. Este tipo de biorreactores son empleados en numerosos estudios de laboratorio para obtener importantes resultados en el área biomédica (Portner et al., 2005).

El biorreactor **RWPV** (Figura 2) favorece el cultivo, el crecimiento y reproducción, de las células eucariotas superiores, haciendo que los agregados de células se muevan en un fluido con bajo nivel de esfuerzos cortantes y adecuado abastecimiento de oxígeno y nutrientes. Su propósito es, mover el fluido de tal forma que el cultivo de células sea exitoso. Este biorreactor consta de un contenedor formado por dos cilindros concéntricos y un disco plano que se encuentra unido a uno de los extremos del cilindro interior. Entre el disco y la pared del contenedor existe un pequeño espacio por donde el fluido con oxígeno y nutrientes es introducido al biorreactor. El cilindro interior y el disco pueden girar a diferente velocidad del cilindro exterior. Los agregados de células se mueven en la región comprendida entre los dos cilindros. El fluido con los productos de desecho sale del contenedor a través de un filtro que se encuentra localizado en el cilindro interior (flujo de salida) y se hace circular por un sistema externo en donde se oxigena y abastece de nutrientes antes de regresar al biorreactor (flujo de entrada) (Portner et al., 2005).

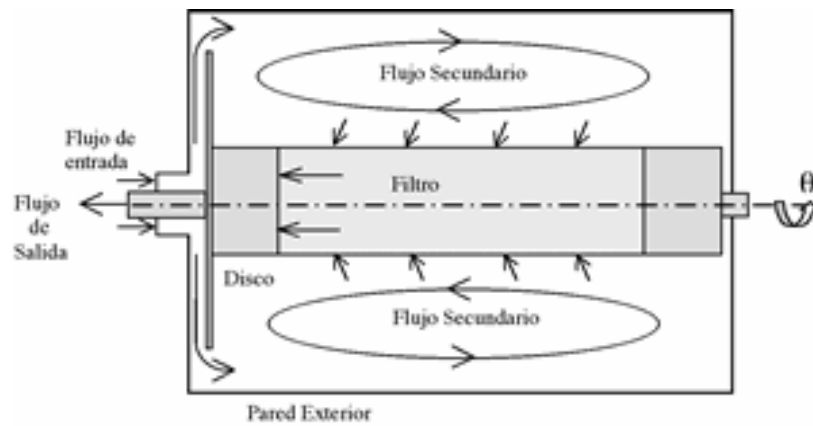


Figura 2. Esquema de un biorreactor de perfusión de paredes rotatorias (RWPV).
Tomados de: <http://www.mty.itesm.mx/die/ddre/transferencia/65/65-III.03.html>

Otro ejemplo de biorreactor utilizado en el cultivo de células eucariotas superiores, es el **Spinner** (Figura 3) en los que el medio es movilizado por un agitador magnético localizado en el piso. En ellos los coeficientes de transporte de masa son bajos cuando la agitación es lenta y los esfuerzos de corte pueden dañar los tejidos, cuando se manejan velocidades de agitación altas. Los biorreactores Spinner tradicionalmente utilizados en ingeniería de tejidos, manejan volúmenes pequeños (<400mL), así que al igual que los reactores estáticos, pueden colocarse dentro de incubadoras que garantizan el suministro de gases y mantienen constante la temperatura del cultivo, aunque pueden ser más grandes (Erazo et al., 2001).



Figura 3. Foto de biorreactores de tanque agitado (Spinner).

Tomado de: http://www.labdepotinc.com/Product_Details~id~739~pid~59934.aspx

Otro tipo de biorreactor usado en cultivo de células eucariotas es el de **membrana de fibra hueca** (HFMB) (Figura 4), que consiste en una fibra hueca que se inserta en un módulo cilíndrico de vidrio. Las células se siembran en la región intermedia de las

fibras y el medio de cultivo es impulsado y llega a las células a través de las paredes de las fibras porosas (Martin et al., 2004).

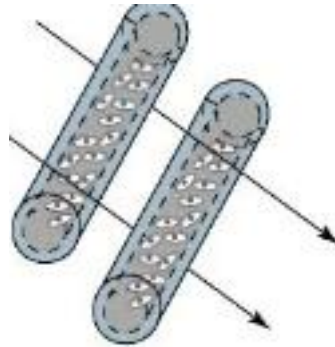


Figura 4. Esquema de biorreactor de fibra hueca. Tomado de <http://www.maths.ox.ac.uk/groups/ociam/research/biologymedicine/tissue-engineering>

Otro modelo de biorreactor utilizado para el cultivo de células eucariotas es el de **paredes giratorias** (Figura 5), el cual está constituido por dos cilindros concéntricos que rotan a una velocidad de 15 a 30 rpm; estos cilindros pueden rotar de forma separada. Las células primero se siembran en minisoportes que se colocan en el espacio localizado entre los dos cilindros del biorreactor, donde quedan suspendidos en el medio. La rotación proporciona una agitación lenta, disminuyendo las fuerzas de corte y proporcionando una adecuada transferencia de masa. Este tipo de biorreactor ha sido probado con éxito en el cultivo de condrocitos (cartílago), osteoblastos y células cardíacas (Pérez et al., 2001).

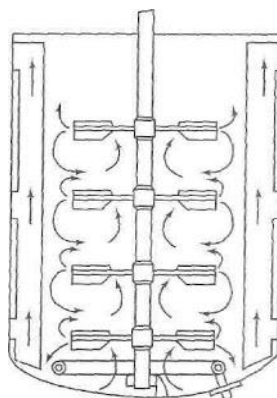


Figura 5. Esquema de biorreactor de paredes giratorias. Tomado de <http://biotecnologiaequipo5.blogspot.com/p/unidad-2-tecnologia-e-instrumentacion.html>

Dentro del cultivo de las células eucariotas superiores, se deben monitorear ciertos factores. Estos factores se dividen en físicos, donde se encuentra el tipo de biorreactor, la temperatura y la agitación; en los factores fisicoquímicos, está el pH, el oxígeno disuelto y el dióxido de carbono disuelto y en los factores biológicos, tipo de célula a cultivar y la densidad celular (Atkinson, 1986).

La temperatura, que es un factor físico muy importante, en la mayoría de los cultivos de células eucariotas debe estar entre 25°C y 37°C para que las células puedan crecer satisfactoriamente; sin embargo, la temperatura óptima, dada las circunstancias de su crecimiento natural (el cuerpo humano) es de 37°C (Casadiegos 2011).

La agitación, en ingeniería de tejidos, es la que se encarga de generar estímulos físicos que permitan el acceso a reguladores y nutrientes (glucosa, aminoácidos y oxígeno, entre otros) hacia las células. La agitación afecta la homogeneidad del acceso a nutrientes, como también la eliminación de los residuos metabólicos celulares y determina la calidad y uniformidad de los productos obtenidos e interviene directamente en la transferencia de masa entre la fase gaseosa y la fase líquida (Abdullah et al., 2007).

La caracterización de la agitación en un biorreactor se calcula midiendo el tiempo de mezclado, el cual es el tiempo requerido por un biorreactor para alcanzar cierto grado de homogeneidad. Se puede medir con una reacción de neutralización ácido-base llevada a cabo dentro del biorreactor. Otra forma es estudiando el comportamiento hidrodinámico dentro del biorreactor para hallar ese grado de homogeneidad entre los componentes del medio de cultivo y las células (Química et al., 2010).

El pH, la concentración de O₂ y de CO₂ que son parámetros fisicoquímicos, son factores determinantes en el crecimiento y el metabolismo celular. Variaciones pequeñas de pH afectan el crecimiento de las células, haciendo necesario el uso de reguladores que mantengan el pH en el rango óptimo para cada tipo de célula. Por ejemplo, el rango de pH óptimo para el cultivo de fibroblastos es de 7,4 a 7,8; mientras que para células osteoblásticas y los condrocitos es de 7,0 a 7,4; y para las células cardiovasculares es de 7,4, pero en general el rango se debe mantener entre 7,0 y 7,8 (Siddiqui et al., 1996).

Uno de los reguladores más utilizados, para mantener el pH en los valores anteriormente mencionados, es la mezcla de bicarbonato de sodio y su ácido conjugado. El pH alto inhibe el metabolismo celular y la síntesis de proteínas, lo cual afecta el crecimiento celular. También, cuando la acción reguladora del tampón es afectada por la concentración de sus componentes o por los residuos del metabolismo de las células, el pH del medio disminuye produciendo estrés y afectando el funcionamiento celular (Mackenzie et al., 1961).

El O₂ es uno de los sustratos indispensables en el metabolismo aerobio de las células. “*In vitro*” se ha demostrado que la concentración de O₂ en el medio influye directamente en el crecimiento y en la expresión génica de las células. Por esto, uno de los fenómenos más importantes en el cultivo de células en biorreactores es la

transferencia de masa de gases, dióxido de carbono y O₂, al medio de cultivo (Keira et al., 2004).

Para lograr una adecuada transferencia de masas entre la fase gaseosa y el medio líquido, es necesario implementar un sistema de aireación eficiente. Los sistemas de microdispersión de gas (burbujeo) son muy utilizados ya que proporcionan una alta transferencia de masa y son fáciles de operar (Ge et al., 2006). Aunque el burbujeo del gas puede causar daño en las células cultivadas (Meuwly et al., 2007), varias estrategias han sido estudiadas para proteger a las células. Entre estas se encuentran el uso de aditivos, soportes o geles que protegen a las células manteniéndolas en su interior y el uso de una velocidad de aireación baja (Miller et al., 2001).

Antes de realizar un cultivo, es importante evaluar las características de la célula que se quiere cultivar, ya que dependiendo de esto las condiciones de cultivo pueden variar. El aislamiento de las células a cultivar, que puede ser a partir de un tejido, a partir de hidrólisis enzimática, a partir de sangre, o directamente como células primarias (Kidambi et al., 2009).

Teniendo el tipo de célula y sabiendo sus características de crecimiento, se debe elegir el mejor tipo de biorreactor, que se adecue mejor, hay que tener en cuenta el tipo de agitación, el tipo de aspas, y si es necesario insertar soportes como en el caso de las células de cartílagos y huesos (Wu et al., 1995).

Por otro lado se debe tener en cuenta el sustrato o medio de cultivo donde van a crecer las células, estos contienen una mezcla compleja de componentes orgánicos, tales como aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos y otros, junto con sales inorgánicas tamponantes. Algunos medios todavía contienen suero sanguíneo o suero bovino (5-20%) para el aporte de factores de crecimiento, elementos traza, lípidos y otros factores desconocidos. Sin embargo, el uso de suero genera muchos problemas, incluyendo la variabilidad del contenido de nutrientes entre lotes, la irregularidad de los suplementos, y más recientemente el miedo a que el suero pueda estar contaminado con partículas virales o priones (Doran et al., 1998).

Las células, pueden crecer como cultivo en suspensión como es el caso de las células sanguíneas, o adheridas a una superficie sólida, como es el caso de las células de cartílago o hueso. Estas superficies sólidas pueden ser fibrillas o también llamados andamios de poliglicolato o las microtransportadoras, las cuales son bolitas porosas que son capaces de flotar en suspensión (Doran et al., 1998).

Dentro de las ventajas del cultivo celular en biorreactores, se puede destacar el constante control que se tiene del medio, del pH, de la temperatura, de la presión osmótica, de la tensión de oxígeno (O₂) y gas carbónico (CO₂) de las células cultivadas y las condiciones fisiológicas que deben ser constantes. Los cultivos de células permiten someter a las mismas a una baja y definida concentración de reactivos asegurando un acceso directo en ellas (Pathi et al., 2005).

Las desventajas del cultivo celular son, que requiere unas condiciones de asepsia estrictas porque las células eucariotas superiores (humanas) se multiplican a una velocidad específica de crecimiento más baja que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los mohos y las levaduras. Además, muchas de las células requieren para su desarrollo además del medio de cultivo, suplementos como suero, plasmas y fluidos tisulares, entre otros para generar de alguna manera las condiciones semejantes a las “*in Vivo*” y pueda que estos productos sean costosos (Levenspiel 1987).

Por otro lado, es necesario conocer el modelo de análisis de la cinética de crecimiento de este tipo de células eucariotas, esta dado por la proliferación celular, el sustrato y la dinámica del biorreactor.

La proliferación celular se representa con la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dN}{dt} = \mu \times N \quad (1)$$

Donde:

dN: Diferencial de número de células.

dt: Diferencial del tiempo.

μ : Es la constante de velocidad de crecimiento.

N: Número de células.

Esto significa que la tasa de crecimiento es directamente proporcional al número de células debido a que más células significan más divisiones.

El número de células esta en función del tiempo. Estas crecen exponencialmente, hasta llegar a la saturación, y se expresa en la siguiente ecuación:

$$N = N_0 \times \exp(t \mu) \quad (2)$$

Donde:

N: Número de células.

N_0 : Número de células iniciales.

t: Tiempo medio de duplicación de las células.

μ : Es la constante de velocidad de crecimiento.

Por otro lado, La cantidad de producción de células por unidad de volumen esta dado por:

$$\mu : rx / xv$$

$$kd : rd / xv$$

$$qp : rp / xv$$

$$qs : rs / xv$$

Donde:

μ : Tasa de crecimiento específico.

rx: Cantidad de biomasa formada.

xv: Células viables.

Kd: Tasa de muerte

rd: Cantidad de células muertas

qp : Formación de producto

rp: Cantidad de producto formado

rs: Cantidad de sustrato consumido

qs :Absorción Específica Sustrato

Según Monod, la relación entre la tasa de crecimiento específico y la concentración del sustrato limitante se expresa en la siguiente ecuación

$$m = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (3)$$

Donde:

μ_{\max} : Tasa máxima de crecimiento específico.

S: Concentración de sustrato limitante.

K_s = constante de afinidad por sustrato

Cuando la concentración de sustrato es más alta, $S > K_s$ numéricamente, K_s puede ser ignorado y entonces S se cancelan entre sí, la tasa de crecimiento específico se acerca a μ_{\max} y la tasa de crecimiento se vuelve independiente de S y es proporcional a la concentración de células.

Cuando la concentración de sustrato es menor que el valor numérico de la constante de saturación, $S < K_s$, entonces S se puede ignorar en el denominador y la tasa de crecimiento específico se convierte en primer orden con respecto de la concentración del sustrato limitante del crecimiento.

La inhibición del crecimiento celular puede ser por diversos factores, como el sustrato, los antibióticos, la acumulación de productos entre otros (Papoutsakis 1991).

4.0. Objetivos

4.1. Objetivo general:

Determinar mediante revisión bibliográfica las condiciones adecuadas y los factores a tener en cuenta para el cultivo de células eucariotas en biorreactores.

4.2. Objetivos específicos:

1. Determinar qué variables deben ser monitoreadas durante el proceso del cultivo de las células eucariotas en biorreactores.
2. Determinar cuál es el tipo de biorreactor con mejor desempeño para el cultivo de células eucariotas.
3. Determinar cuál es el modelo de análisis de la cinética de crecimiento de este tipo de células.

5.0. Metodología

Se realizó una revisión de la literatura de estudios en los cuales se ha evaluado el cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores.

Se generó un lista de factores que se deben evaluar en este tipo de cultivos, donde se encuentran: biorreactor, medio de cultivo, aireación, pH, temperatura, presión, agitación y el crecimiento de las células.

Criterios para considerar estudios en esta revisión

Se tuvo en cuenta los siguientes criterios de inclusión para los estudios que se utilizaron en esta revisión de la literatura.

Tipos de estudio

Se incluyeron artículos en los que se habla de cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas), en idiomas inglés y español, que estén en el rango de años de 1990 al 2012.

Método de búsqueda

Se realizó una búsqueda a través de las bases de datos:

-ScienceDirect.

-EBSCO.

-ProQuest.

-ISI.

-Scopus.

-SCIELO.

-REDALYC.

Para la búsqueda se tuvo en cuenta las siguientes palabras y frases clave, tanto en inglés como en español:

- Cultivo de células eucariotas en biorreactores.
- Ingeniería de tejidos.
- Cultivo de Células madre.
- Cultivo de fibroblastos, células sanguíneas, condriocitos y células osteoblásticas.

Selección de las publicaciones

Se revisaron los títulos y resúmenes de los estudios que arrojó la búsqueda y con base en los criterios para el estudio se seleccionaron o no.

Criterios de exclusión

Se excluyeron estudios en los cuales se habla del cultivo de células eucariotas superiores en condiciones estáticas y estudios donde no se evalúan los factores de interés dentro del biorreactor.

6.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención de datos

Se encontró un total de 152 artículos en las diferentes bases de datos; de estos se seleccionaron 45 artículos, los cuales se organizaron por tipo de célula y a la vez por año (Tabla 1) (figura 1) (figura 2) , y de estos se extrajo el tipo de biorreactor usado, los factores que se deben tener en cuenta para realizar el cultivo de las células eucariotas superiores y el monitoreo que se debe realizar durante el tiempo del cultivo y los modelos de análisis de cinética de crecimiento de las células utilizados por los diferentes autores.

Se incluyeron artículos de revistas en los que se utilizó biorreactores como método de cultivo de células eucariotas superiores (humanas) y se excluyeron artículos en los que el tipo de cultivo se realizó en placas estáticas y en los que las células no fueran células eucariotas superiores.

Tabla 1. Número de artículos encontrados y seleccionados en las bases de datos empleadas.

Base de Datos	Artículos encontrados	Artículos Pre-seleccionados	Artículos Seleccionados	% de inclusión
-ScienceDirect. -EBSCO. -ProQuest. -ISI. -Scopus. -SCIELO. -REDALYC.	152	62	45	29,6

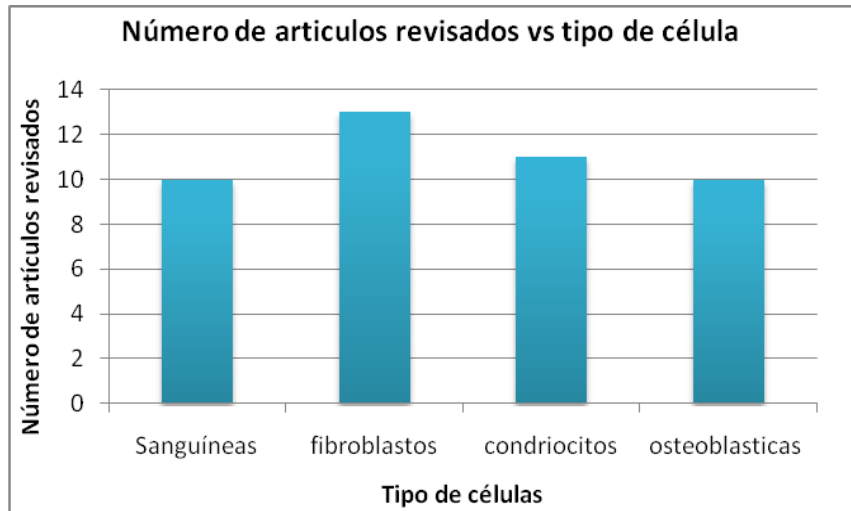


Figura 1 . Diferencia del número de artículos encontrados de cada tipo de célula eucariota superior (humana).

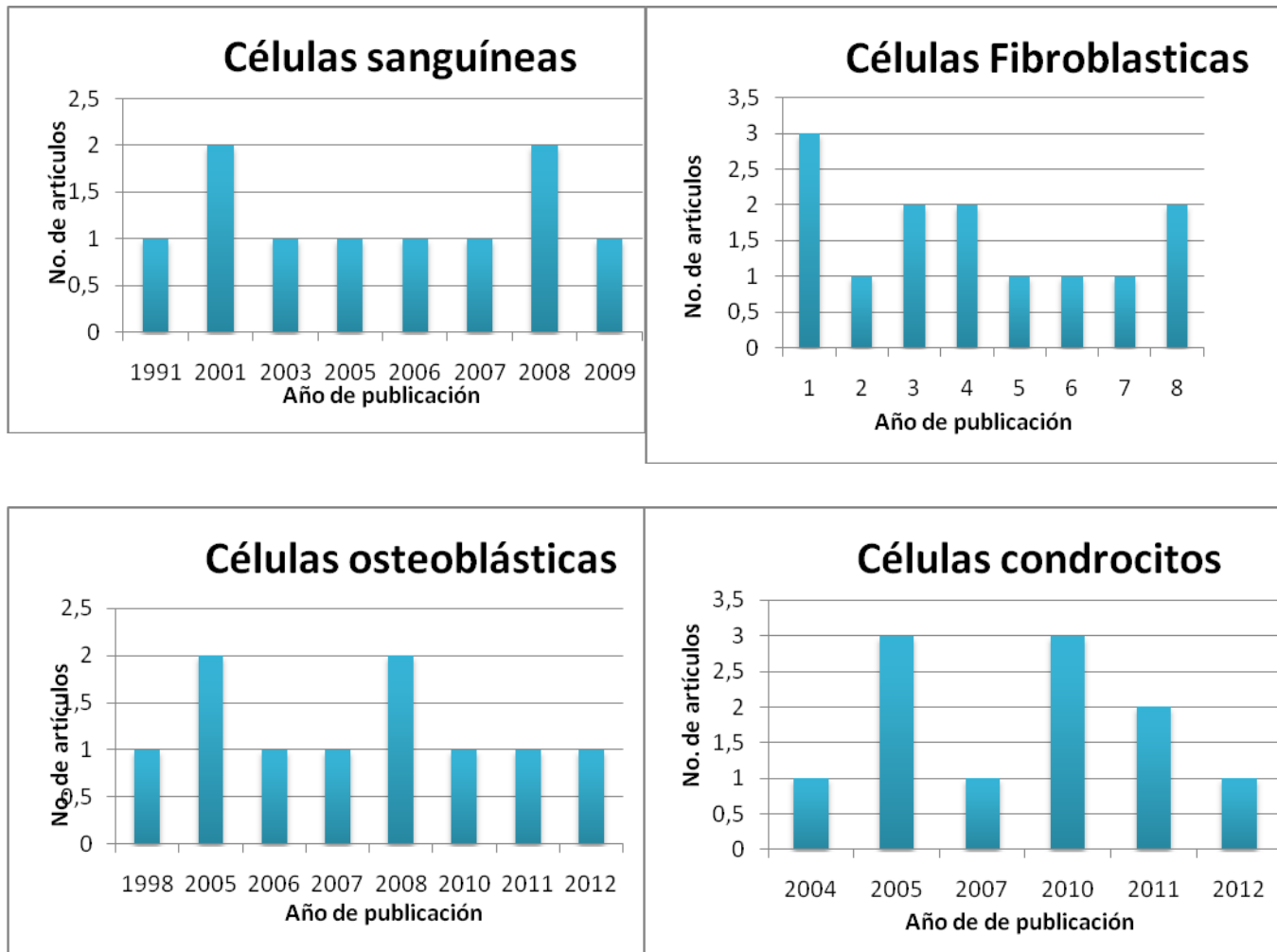


Figura 2. Número de artículos revisados por tipo de células en diferentes años.

Tabla 2. Tipo de biorreactor, de células y factores evaluados en los artículos revisados.

Referencia	Tipo de célula	Tipo de Biorreactor	Factores que se evaluaron
(Papoutsakis 1991)	sanguíneas	tanque agitado	Agitación
(Chu et al., 2001)	sanguíneas y fibroblastos	tanque agitado	Oxígeno
(Chisti 2001)	sanguíneas	tanque agitado	Agitación
(Marks 2003)	sanguíneas	tanque agitado	Oxígeno
(Pörtner et al., 2005)	células sanguíneas	tanque agitado	pH, temperatura, oxígeno, nutrientes Agitación Transferencia de masa
	hepatocitos, fibroblastos Condrocito, fibroblastos y osteoblásticas	fibra hueca pared giratoria	
(Nienow 2006)	sanguíneas	tanque agitado	Homogeneidad

Referencia	Tipo de célula	Tipo de Biorreactor	Factores que se evaluaron
(Palomares et al., 2007)	sanguineas	tanque agitado	Oxígeno Agitación
(Castaño 2008)	sanguineas	tanque agitado	Soportes Desprendimiento de las células Cuantificación Medios
(Garzón Alvarado et al., 2008)	sanguineas	Tanque agitado	Agitación
(Papenburg et al., 2009)	sanguíneas	Tanque agitado	Agitación
(Balin et al., 2002)	Fibroblastos	Tanque agitado	Oxígeno

Referencia	Tipo de célula	Tipo de Biorreactor	Factores que se evaluaron
(Frahm et al., 2002)	Fibroblastos	Reactor batch	CO ₂
(Ratcliffe et al., 2002)	Fibroblastos	Tanque agitado	Agitación
(Orive et al., 2009) (Lichtenberg et al., 2005)	Fibroblastos Fibroblastos	Fibra hueca Fibra hueca	Crecimiento pH
			Tensión de oxígeno Viabilidad Aire y CO ₂ O ₂ CO ₂ Temperatura
(Wurm 2004)	Fibroblastos	Tanque agitado	Reactor vs. placas estáticas
(Ge et al., 2006)	Fibroblastos	Tanque agitado	Medio de cultivo
			Parámetros que se evalúan
(Martin et al., 2005)	Fibroblastos	Tanque de agitado	O ₂ Transferencias de masas

Referencia	Tipo de célula	Tipo de Biorreactor	Factores que se evaluaron Oxígeno
			Eliminación de desechos nitrogenados
(Sengers et al., 2007) (Meuwly et al., 2007)	Fibroblastos Fibroblastos	Tanque agitado Paredes giratorias	Soporte Oxígeno
(Netterwald et al., 2008)	Fibroblastos	Tanque de agitado	Soprote
(Eibl et al., 2010)	Fibroblastos	Fibra hueca	Volumen
(Casadiegos 2011)	Fibroblastos	Tanque agitado	CO ₂ y O ₂

Referencia	Tipo de célula	Tipo de Biorreactor	Factores que se evaluaron
(Cura et al., 2011)	Fibroblastos	Paredes giratorias	pH Oxígeno
(Bueno 2004)	Condrocitos	Paredes onduladas	RPM
(Bilgen 2006)	Condrocito	Pared giratoria Tanque agitado Turbina de Rushton	Tensión de cizallamiento Andamios de ácido poliglicólico
(Tare et al., 2005)	Condrocitos	Biorreactor cilindro concéntrico Pared giratoria	Soporte
(Wendt et al., 2005) (Chung et al., 2008)	Condrocitos	Pared giratoria	Factores
(Mueller-Rath et al., 2010)	Condrocitos	Tanque agitado	
(Landro et al., 2010)	Condrocito	Tanque agitado	Crecimiento
(Landínez et al., 2010)	Condrocito	Pared giratoria	rpm

Referencia	Tipo de célula	Tipo de Biorreactor	Factores que se evaluaron
(Garrido 2011)	Condrocito	Tanque agitado	Sorpote
(Stoffel et al., 2012)	Condrocitos	Pared giratoria	T y CO ₂
(Garza Veloz 2012)	Condrocito	RWPV	T y CO ₂
(Granet et al., 1998)	Osteoblásticas	Paredes giratorias	Crecimiento y morfología
(Ye et al., 2006)	Osteoblásticas	Fibra hueca	Difusión de nutrientes y desechos
(Amulya 2005)	Osteoblásticas	Fibras huecas	Flujos
(Estrada et al., 2006)	Osteoblásticas	RWPV	Matrices
(Pérez et al., 2007)	Osteoblásticas	Fibras huecas	Cultivo

Referencia	Tipo de célula	Tipo de Biorreactor	Factores que se evaluaron
(Cortés et al., 2008)	Osteoblásticas	Fibra hueca	Matrices
(Whittaker et al., 2009)	Osteoblásticas	Fibra hueca	Medio
(Salas 2012)	Osteoblásticas	RWPV	Agitación Temperatura
(Shahin et al., 2011)	Osteoblásticas	Tanque agitado	CO ₂ Agitación
(Saucedo Acuña et al., 2012)	Osteoblásticas	Fibras huecas	Soporte

6.2. Biorreactores con mejor desempeño para cada célula eucariota

Los biorreactores se han diseñado para mejorar las condiciones de cultivo de células eucariotas superiores, y superar las limitaciones de transferencia de nutrientes, de oxígeno, y el esfuerzo de las fuerzas mecánicas e hidrodinámicas que influyen en el desarrollo de células y tejidos (Chu et al., 2001).

En los reactores biológicos utilizados para crecer células o tejidos, el diseño es significativamente distinto al de los reactores biológicos industriales. Muchas células y tejidos, requieren una superficie u otro soporte estructural para poder crecer y los ambientes agitados son comúnmente dañinos para estos tipos de células y tejidos (Marks 2003; Portner et al., 2005; Nienow 2006).

6.3.1. Células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas)

Los cultivos de células eucariotas superiores, que se realizan en suspensión, suelen coincidir con los de aquellas células que “*in vivo*” son circulantes, en general células sanguíneas. El cultivo de células en suspensión tiene algunas ventajas: mayor facilidad de manipulación y pase de un cultivo al siguiente pues no requieren separación del sustrato (Papoutsakis 1991; Chisti 2001).

Estas células, generalmente se obtienen de sangre de cordón umbilical, células madre hematopoyéticas, las cuales se consideran células primitivas capaces de dividirse para producir los distintos tipos de células sanguíneas (Chu et al., 2001).

Estas células se cultivan generalmente en biorreactor tipo spinner, ya que necesita esa dinámica que genera la agitación en este biorreactor por sus características de flujo, además se siembran a un pH óptimo de 7,2 a 7,4, una agitación de 20 a 30 rpm y una concentración de aire de 95% y de CO₂ de 5% (Palomares et al., 2007).

6.3.2. Fibroblastos

Los fibroblastos normalmente degradan y sintetizan constantemente los diferentes elementos de la matriz extracelular, pero también remodelan los tejidos en reparación. Los fibroblastos dérmicos son los más estudiados “*in vitro*” e “*in vivo*” y se emplean para regenerar la matriz extracelular dérmica que sirve de apoyo para la regeneración de la epidermis (Frahm et al., 2002; Balin et al., 2002).

Los fibroblastos son células muy versátiles que tienen la capacidad de diferenciarse en otras células del tejido conectivo en respuesta a un daño o a estímulos adecuados. Existen evidencias de que los fibroblastos son células tejido-específicas, es decir, que presentan diferencias dependiendo del tejido al que pertenecen (Ratcliffe et al., 2002, Lichtenberg et al., 2005).

El cultivo ideal para este tipo de células, es en los biorreactores tipo spinner, a un pH de 7,8; una agitación que puede ser de 15 a 30 rpm y una concentración de oxígeno de las que se debe mantener normalmente entre 20% y 100% de saturación de aire para

mantener un cierto equilibrio entre las necesidades de oxígeno y la tolerancia a los radicales libres de las células (Orive et al., 2009; Wurm 2004; Ge et al., 2006; Sengers et al., 2007).

6.3.3. Condrocitos (células de cartílago)

El 27 de febrero de 2002, en la Reunión de la Sociedad Americana de Investigación Ortopédica, celebrada en San Francisco, un equipo de la Universidad de Duke, dirigido por Guilak y Erickson, presentó resultados de su trabajo, demostrando la posibilidad de obtener condrocitos (células de cartílago) a partir de adipocitos humanos (grasa) obtenidos de restos de liposucción. Además, también consiguieron cultivar estos condrocitos sobre una matriz tridimensional, obteniendo una estructura similar al tejido cartilaginoso, lo que sin duda puede ser un paso de gigante para la consecución de cartílagos. Este podría ser el primer paso para la solución de lesiones de cartílagos de pacientes utilizando su propia grasa (Bueno et al., 2004; Wendt et al., 2005; Mueller-Rath et al., 2010).

El cultivo ideal de este tipo de células es en un biorreactor RWPV, biorreactor de fibra hueca y biorreactor de paredes giratorias, ya que estos tres tipos de biorreactores dentro de su composición, tienen una estructura donde las células se adhieren y pueden obtener la forma tridimensional deseada. Una vez acabado el cultivo, las células deben ser despegadas de las estructuras de adherencia mediante tripsinización, aunque se han empezado a utilizar soportes de ácido poliglicolato, material que se adsorbe y queda la estructura en 3D (Landro et al., 2010; Tare et al., 2005; Bilgen et al., 2006).

Estas células se deben mantener en un pH de $7,4 \pm 0,2$; con una agitación de 50 rpm y con una concentración de oxígeno de $183,7 \pm 18,4$ mmHg (Landínes et al., 2010; Garrido 2011; Garza 2012; Stoffel et al., 2012)

6.3.4. Células osteoblásticas

Las células osteoblásticas necesitan una superficie sólida sobre la cual crecer. Por esto tiene las mismas características de los condrocitos y se cultiva de la misma forma (Granet et al., 1998; Amulya , 2005; Cortés et al., 2008).

El biorreactor óptimo es el de fibra hueca, estas se pueden hacer de acetato de polímeros acrílicos o fibras polisulfonadas con figuraciones de pared asimétricas (Salas 2010; Whittaker et al., 2009).

Las condiciones de pH son de $7,4 \pm 0,2$; agitación de 50 rpm y concentración de oxígeno mayor a $183,7 \pm 18,4$ mmHg por la estructura más rígida que en el caso de los condorcitos (Saucedo et al., 2012; Shahin et al., 2011).

6.4. Variables que deben ser monitoreadas durante el proceso del cultivo de las células eucariotas en biorreactores.

6.4.1. Temperatura

Todos los autores de los artículos revisados, coinciden en que la temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células, de ahí la importancia de un buen control de ésta en la incubación (Salas 2010; Lichtenberg et al., 2005).

La temperatura influye en el pH del medio, por lo que se recomienda ajustar el pH del medio 0,2 unidades por debajo del pH óptimo, a temperatura ambiente, o preparar el medio, ajustar la temperatura y luego si el pH, antes de realizar el cultivo de las células (Portner et al., 2005).

6.4.2. pH

El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de tipos celulares es de 7,4 aunque existen pequeñas variaciones, algunos cultivos como el de los fibroblasto crecen mejor a pH 7,8 (Casadiegos 2011).

El indicador de pH que se suele emplear es rojo fenol, que presenta color rojo a pH 7,4, naranja a pH 7,0; amarillo a pH 6,5; azul-rojo a pH 7,6 y púrpura a pH 7,8. El medio de cultivo debe tener un tampón, a fin de evitar los cambios fuertes de pH. La solución tampón más empleada sigue siendo de bicarbonato, que equilibra el CO₂ atmosférico, a pesar de su escasa capacidad tamponadora, se usa debido a su bajo costo, baja toxicidad, y beneficios nutricionales para el cultivo. Otro tampón empleado en cultivos de células eucariotas es el HEPES, el cual es la solución tamponadora de elección por su elevada capacidad tamponadora en el rango 7,2 a 7,6, y se emplea en concentraciones de 10 a 20 mM (Ge et al., 2006; Lichtenberg et al., 2005; Palomares et al., 2007; Marks 2003; Netterwald et al., 2008).

6.4.3. Oxígeno

La velocidad de transferencia de O₂ de la fase gaseosa hasta la fase líquida está determinada por la siguiente ecuación:

$$R_o = K_L a (C^* - C) \quad (4)$$

Donde:

K_{La}: Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

C: Concentración de O₂ disuelto en el líquido.

C^* : la concentración de O_2 disuelto en equilibrio con la presión parcial de oxígeno de la fase gaseosa.

El K_{La} y por lo tanto el grado de transferencia de oxígeno del líquido hasta las células dependen del diseño del biorreactor y de las condiciones de operación del sistema de cultivo: caudal de aire, volumen del líquido, régimen de agitación, área de transferencia y viscosidad del cultivo.

En general:

El K_{La} disminuye con la viscosidad y el volumen del líquido y el K_{La} aumenta con el área de transferencia y la agitación (Chung et al., 2008; Garza 2012).

La forma más fácil de obtener el oxígeno para el biorreactor es por medio del aire, ya que el aire está compuesto de 21% (v/v) de oxígeno y además es gratis y nos ayuda a economizar costos en el proceso de los cultivos de células eucariotas superiores (Wendt et al., 2005).

Un sistema de aireación consta de cuatro partes mecánicas: fuente de aire; tubería y filtros de entrada; boquilla y difusor de aire; tubería y filtros de salida. Y tres partes de control: control de flujo aire; control de presión de aire; control de difusión de oxígeno disuelto (Wurm 2004).

El sistema de difusión de oxígeno disuelto debe optimizar al máximo la transferencia de oxígeno disuelto al medio líquido. El sistema consta de dos partes mecánicas: boquilla y difusor de aire; una parte de medición: sensor de oxígeno disuelto y una de control: controlador de oxígeno disuelto; además, de regular el flujo y la presión del aire en la línea o tubería, se debe controlar el valor y la concentración del oxígeno disuelto (OD) dentro del medio líquido; variable que puede medirse en dos formas:

El oxígeno disuelto (OD), es la concentración de oxígeno disuelto requerido para la reducción química de un equivalente en iones sulfito (de sodio) a la cantidad de materia orgánica presente en el medio líquido que se debe oxidar (Casadiegos 2011).

El oxígeno debe ser aportado continuamente ya que es escasamente soluble en una solución acuosa. La transferencia de oxígeno del gas hacia las células se lleva a cabo en varias etapas. Primero el oxígeno debe viajar a través del gas hacia la interfase gas-líquido, después a través del líquido y, finalmente, hacia la célula (Frahm et al., 2012).

Usualmente es imposible determinar las concentraciones locales en todas las partes de un biorreactor, se deben usar valores promedio de las concentraciones y de los coeficientes de transferencia de masa. Para conocer la rapidez total de transferencia de oxígeno en un recipiente, se tiene que determinar el área superficial total disponible para la transferencia de oxígeno. Esta es una cantidad difícil de evaluar, de modo que se usa coeficiente global de transferencia de masa que incorpora el área superficial de las burbujas (Casadiegos 2011)

6.4.4. Agitación

El agitador en los biorreactores, puede ser accionado desde la parte superior o desde la parte inferior. Todos los tanques están provistos con mamparas que evitan la formación de un gran vértice central y mejoran el mezclado (Papenburg et al., 2009).

La finalidad de la agitación en un biorreactor es dispersar el aire suministrado, obtener una temperatura y una concentración de nutrientes en todo el recipiente (Ratcliffe et al., 2002).

Existen varios tipos de agitadores, que son usados en biorreactores, el más utilizado y el que hace parte del biorreactor tipo spinner es la turbina de Rushton, que consta de varias paletas sujetas a un eje central. El diámetro de una turbina está normalmente entre el 30 y el 50% del diámetro del tanque y, por lo general, hay entre cuatro a seis paletas. Las turbinas con aspas planas dan un flujo radial, lo cual es bueno para dispersar el gas cuando es introducido justo por debajo del impulsor sobre el eje y es llevado hacia las aspas y se rompe en finas burbujas (Miller et al., 2001; Meuwli et al., 2007).

Antes de hacer un repaso acerca de los biorreactores es importante considerar detalles de los factores principales que afectan el diseño de un biorreactor. Transferencia de oxígeno y los efectos de corte (Orive et al., 2009; Shahin et al., 2011).

6.4.5. Medio de cultivo

Los principales medios empleados y sus aplicaciones son:

Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM). Es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos. Se usa para casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero bovino (10% v/v) (Tabla 3) (Morgan et al., 1995).

El medio DMEM, es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, selenito, entre otros componentes. Es muy útil para el cultivo de células sanguíneas en medio libre de suero. También sirve para otros tipos celulares, pero en ese caso requiere suero a bajas concentraciones (Tabla 3) (Morgan et al., 1995).

EL medio McCoy 5A fue diseñado para el crecimiento de células eucariotas superiores como de médula ósea, piel, hígado y riñón entre otros. Compuesto por sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos entre otros componentes.

El Medio F-10 de Ham es usado para el crecimiento de células eucariotas superiores y debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene metales como Fe, Cu, Zn entre otros componentes.

Dentro de los componentes con que se suplementan los medios, los más utilizados son:

Aminoácidos: Es necesario suplementar el medio basal con los aminoácidos esenciales. Un suplemento común es la glutamina (Stoffel et al., 2012).

Vitaminas: El medio MEM se suplemente con vitaminas del grupo B ya que los otros grupos de vitaminas, los aporta el suero bovino. En medios más definidos se suplementan todas las vitaminas. La limitación de vitaminas se manifiesta en la supervivencia de las células y en la reducción de la tasa de crecimiento más que en la densidad celular (Morgan et al., 1995).

Glucosa: Es la fuente de energía en muchos medios.

Hormonas y factores de crecimiento: En los medios no definidos suele aportarlos el suero humano, en los que son definidos, es importante agregarlos.

Tabla 3. Comparación entre los dos medios de cultivos más usados.

componentes	MEM (mg/L)	DMEM (mg/L)
CaCl ₂ . 2H ₂ O	264	264
Fe (NO ₃) ₃ 9H ₂ O	-	0,1
Kcl	400	400
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	200	200
NaCl	6800	6400
NaHCO ₃	2200	3700
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	158	141
D-glucosa	1000	4500
Rojo fenol	10	15
Piruvato sódico	-	110
L-arginina. HCl	126	84
L-cistina	24	48
L- glutamina	292	584
Glicina	-	30
L-histidina . HCL . H ₂ O	42	42
L-isoleucina	52	105
L-leucina	52	105
L.lisina . HCL	73	146
L-metionina	15	30
L-serina	-	42
L-treonina	48	95
L-triptófano	10	16
L-tirosina	36	72
L-valina	-	94
D-Ca pantotenato	1	4
Cloruro de colina	1	4
Ácido fólico	1	4
Nicotinamida	2	7,2
Ácido para-aminobenzoico	1	4

Riboflavina	0,1	0,4
Tiamina . HCL	1	4
	MEM (mg/L)	DMEM (mg/L)
CaCl ₂ . 2H ₂ O	264	264
Fe (NO ₃) ₃ 9H ₂ O	-	0,1
Kcl	400	400
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	200	200
NaCl	6800	6400
NaHCO ₃	2200	3700
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	158	141
D-glucosa	1000	4500
Rojo fenol	10	15
Piruvato sódico	-	110
L-arginina. HCl	126	84
L-cistina	24	48
L- glutamina	292	584
Glicina	-	30
L-histidina . HCL . H ₂ O	42	42
L-isoleucina	52	105
L-leucina	52	105
L.lisina . HCL	73	146
L-metionina	15	30
L-serina	-	42
L-treonina	48	95
L-triptófano	10	16
L-tirosina	36	72
L-valina	-	94
D-Ca pantotenato	1	4
Cloruro de colina	1	4
Ácido fólico	1	4
Nicotinamida	2	7,2
Ácido para-aminobenzoico	1	4
Riboflavina	0,1	0,4
Tiamina . HCL	1	4

En esta tabla se comparan dos medios diferentes MEM y DMEM. El MEM, es un medio básico adecuado para cultivo de células menos exigente. El DMEM es relativamente más rico. Los componentes son formulaciones básicas y en la actualidad existen muchas versiones alternativas (Morgan et al., 1995).

6.5. Modelo de análisis de la cinética de crecimiento de este tipo de células.

En 1986, las células que se cultivaban en placas (condiciones estáticas) alcanzaban una densidad máxima de aproximadamente 2×10^6 células/ml. En el proceso llevado a cabo en 2004, en biorreactores (condiciones dinámicas) el cultivo se inició a una baja densidad celular de aproximadamente 100.000 células/ml y rápidamente creció hasta una densidad de más de 10×10^6 células/ml (Papoutsakis 1991).

Las altas concentraciones de células obtenidas en los procesos de hoy en día son el resultado de años de investigación que ha conducido a una mejor comprensión de la expresión de genes, el metabolismo, el crecimiento y el retraso de la apoptosis en células de mamífero.

En todos los estudios consultados, el conteo de las células cultivadas se realiza por el método tradicional de la cámara de Neubauer, es decir que se cuenta la cantidad de células inicial y a medida que pasan las horas se realizan nuevos conteos.

Como en todos los crecimientos de células, se determina una curva de crecimiento para determinar la cinética de crecimiento (Papoutsakis 1991).

7.0. CONCLUSIONES

En comparación con el cultivo de células estática, estudios han evidenciado el efecto positivo de las condiciones dinámicas en cultivo de células eucariotas superiores, que se da en un biorreactor. Este efecto se ve en el crecimiento y supervivencia de las células debido a la transferencia superior de nutrientes y gases, así como el estrés de la agitación.

Existen varios tipos de biorreactores, pero los utilizados para células eucariotas superiores deben tener ciertas características que favorezcan su crecimiento. Por ello, sólo se usan 4 tipos de todos los existentes. El biorreactor tipo spinne, el RWPV, el de fibras huecas y el de pared agitada.

Los factores que se deben evaluar y sus valores óptimos, varían de un tipo de célula a otro, sin embargo los rangos de pH están de 7,0 a 7,8, la temperatura debe mantenerse entre 25°C y 37°C, la tensión de oxígeno debe ser de 137 mm Hg y de aire 95% y 5% CO₂.

Las altas concentraciones de células obtenidas en los procesos de hoy en día son el resultado de años de investigación, el conteo de las células cultivadas se realiza por el método tradicional de la camarada de Neubauer, es decir que se cuenta la cantidad de células inicial y a medida que pasan las horas se realizan nuevos conteos. Como en todos los crecimientos de células, se determina una curva de crecimiento para determinar la cinética de crecimiento

8.0. BIBLIOGRAFÍA

Abdullah N, Das D (2007) Modelling nutrient transport in hollow fibre membrane bioreactor for growing bone tissue with consideration of multi-component interactions. *Chemical Engineering Science* 62 (21): 5821-5839.

Amulya, K. Ingeniería tisular: conceptos y estrategias actuales. 2005

Arévalo P, Díaz JF (2005) Construcción y puesta en marcha de un biorreactor para el crecimiento de fibroblastos en mallas de colágeno tipo I. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional, Colombia.

Atkinson B (1986) Reactores químicos. Reverte Editorial S.A.

Balin AK, Pratt L (2002) Oxygen modulates the growth of skin fibroblasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 38 (5): 305-310.

Bilgen B, Sucosky P, Neitzel GP, Barabino GA (2006) Flow characterization of a wavy-walled bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering* 95 (6): 1009-1022.

Bueno EM, Bilgen B, Carrier RL, Barabino GA (2004) Increased rate of chondrocyte aggregation in a wavy-walled bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 88 (6): 767-777.

Casadiegos RSA (2011) Evaluación de la transferencia de CO₂ al medio de cultivo en un biorreactor tipo Spinner para el cultivo de fibroblastos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional, Colombia.

Castaño ME (2008) Cultivos celulares. En: Principios de virología. Urcuquí S, Ossa J, Antioquia, Colombia, pp 29-46

Chisti Y (2001) Hydrodynamic damage to animal cells. *Critical Reviews in Biotechnology* 21 (2): 67-110.

Chu L, Robinson DK (2001) Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology* 12 (2): 180-187.

Chung C, Burdick JA (2008) Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2): 243-262.

Cortés RBP, Valdez S, Casolco SR (2008) La Ingeniería de Tejidos óseos. 54: 54-61.

Cura AC, Campana DM, Di Paolo J (2011) Propuesta de un nuevo diseño de biorreactor para crecimiento de tejido cartilaginoso. Grupo Biomecánica Computacional, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina.

Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química (2010) Reactores químicos. <http://www.uco.es/dptos/ing-quimica/ing-q/unid->

quimica/docencia/quimica/reactores/material_apoyo/Problemas%20RQ%2010_11.pdf
Consultado Febrero 2013.

Doran PM, García Labiano FJ (1998) Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia Zaragoza España, pp 468.

Eibl R, Kaiser S, Lombriser R, Eibl D (2010) Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (1): 41-49.

Erazo R, Cárdenas JL (2001) Determinación experimental del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) en un biorreactor batch. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* 4 (2): 22-27.

Estrada C, Paz AC, López LE (2006) Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. *Revista EIA Escuela de Ingeniería de Antioquia* 5: 93-100.

Frahm B, Blank H, Cornand P, Oelßner W, Guth U, et al (2002) Determination of dissolved CO₂ concentration and CO₂ production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement. *Journal of Biotechnology* 99 (2): 133-148.

Garrido FM (2011) Ingeniería tisular y medicina regenerativa en cirugía pediátrica. *Revista Chilena de Cirugía* 63 (6): 635-640.

Garza VI (2012) Desarrollo de un Implante de CMM Modificadas Genéticamente para Reemplazo de Cartílago .

Garzón ADA, Roa GMA, Ramírez MAM (2008) Factores que influyen en el crecimiento endocondral: experimentos y modelos. *Revista Cubana de Ortopedia y Traumatología* 22 (1): 0-0.

Ge X, Hanson M, Shen H, Kostov Y, Brorson KA, et al (2006) Validation of an optical sensor-based high-throughput bioreactor system for mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology* 122 (3): 293-306.

Granet C, Laroche N, Vico L, Alexandre C, Lafage-Proust M (1998) Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions. *Medical and Biological Engineering and Computing* 36 (4): 513-519.

Keira SM, Ferreira LM, Gagnani A, Duarte IdS, Santos, Isabel Anunciação Neves dos (2004) Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cirurgica Brasileira* 19: 11-16.

Kidambi S, Yarmush RS, Novik E, Chao P, Yarmush ML, Nahmias Y (2009) Oxygen-mediated enhancement of primary hepatocyte metabolism, functional polarization, gene expression, and drug clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (37): 15714-15719.

Korossis S, Bolland F, Kearney J, Fisher J, Ingham E (2005) Bioreactors in tissue engineering. *Topics Tissue Eng* 2: 1-23.

Landínez NS, Garzón Alvarado DA, Cardozo de Martínez, Carmen Alicia (2010) Aproximación al cultivo de condrocitos en la Universidad Nacional de Colombia: Reporte técnico. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 29 (1): 0-0.

Landro ME, Francalaccia V, Douglas Price AL (2010) Medicina regenerativa: Su aplicación en traumatología. *Revista de la Asociación Argentina de Ortopedia y Traumatología* 75 (4): 398-403.

Levenspiel O (1987) Ingeniería de las reacciones químicas. Reverté, D.F., México.

Lichtenberg A, Dumlu G, Walles T, Maringka M, Ringes-Lichtenberg S, et al (2005) A multifunctional bioreactor for three-dimensional cell (co)-culture. *Biomaterials* 26 (5): 555-562.

Mackenzie CG, Mackenzie JB, Beck P (1961) The effect of pH on growth, protein synthesis, and lipid-rich particles of cultured mammalian cells. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9 (1): 141-156.

Marks DM (2003) Equipment design considerations for large scale cell culture. *Cytotechnology* 42 (1): 21-33.

Martin I, Wendt D, Heberer M (2004) The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology* 22 (2): 80-86.

Martin Y, Vermette P (2005) Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 26 (35): 7481-7503.

Martin I, Riboldi SA, Jakob M, Wendt D (2010) SnapShot: Bioreactors systems in tissue engineering (TE) & regenerative medicine (RM). *Biomaterials* 31 (11): 3114-3115.

Meuwly F, Ruffieux P, Kadouri A, von Stockar U (2007) Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: bioprocess and biomedical applications. *Biotechnology Advances* 25 (1): 45-56.

Miller WM, De Zengotita VM, Schmelzer AE, Abston LR, Chen Y (2001) Environmental effects on cell physiology and metabolism: response to elevated pCO₂. Oral Presentation at the Nineteenth ESACT Meeting, Tylösand, Sweden.

Morgan SJ, Darling DC, García Sánchez J (1995) Cultivo de células animales. Acribia Zaragoza España, pp 159.

Mueller-Rath R, Gavénis K, Andereya S, Mumme T, Albrand M, et al (2010) Condensed cellular seeded collagen gel as an improved biomaterial for tissue engineering of articular cartilage. *Bio-medical Materials and Engineering* 20 (6): 317-328.

Netterwald J (2008) Mass production bioreactors purposely designed for pharmaceutical protein production in mammalian cell lines sustain higher culture volumes, cell type

variation, and more to meet demands of bipharma. *Drug Discovery & Development*: 36-38.

Nienow AW (2006) Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology* 50 (1-3): 9-33.

Orive G, Hernández RM, Garcón AR, Igartúa M, Pedráz JL (2009) Ingeniería tisular: retos y realidades. *Vitae* 10 (2).

Palomares LA, Valdez-Cruz NA, Ramírez OT (2007) Superando los retos del cultivo de células animales a través de la bioingeniería. *Biotechnología* 14: 385-398.

Papenburg BJ, Liu J, Higuera GA, Barradas A, de Boer J, et al (2009) Development and analysis of multi-layer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 30 (31): 6228-6239.

Papoutsakis ET (1991) Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *Trends in Biotechnology* 9 (1): 427-437.

Pathi P, Ma T, Locke BR (2005) Role of nutrient supply on cell growth in bioreactor design for tissue engineering of hematopoietic cells. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (7): 743-758.

Pérez A, Rodríguez N, Gil J, Ramírez G (2001) Programa sistemático para el cálculo del tamaño de la muestra y el poder en diseños de investigación. Ver. 1.1. (Bogotá) Unidad de epidemiología clínica y bioestadística. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Javeriana.

Pérez JCJ, Garza VI, Ortiz López R (2007) Células madre. *Medicina Universitaria* 9 (36): 130-140.

Pörtner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM (2005) Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (3): 235-245.

Ramírez O.T (2007) Ingeniería bioquímica. En: Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Bolívar F, México, pp 249-297

Ratcliffe A, Niklason LE (2002) Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences* 961 (1): 210-215.

Salas MJL (2010) Obtención de cardiomiocitos a partir de CMMO: evaluación de la diferenciación y funcionalidad para su utilización en cultivos en 3D. Tesis de Maestría. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México.

Saucedo ARA, Galicia GM, Ríos AJV, Reyes LSY (2012) Corrección de defectos óseos en el área de Ingeniería tisular. *Acta Universitaria* 22 (8): 26-32.

Sengers BG, Taylor M, Please CP, Oreffo R (2007) Computational modelling of cell spreading and tissue regeneration in porous scaffolds. *Biomaterials* 28 (10): 1926-1940.

Shahin K, Doran PM (2011) Strategies for enhancing the accumulation and retention of extracellular matrix in tissue-engineered cartilage cultured in bioreactors. *PLoS One* 6 (8): e23119.

Siddiqui A, Galiano RD, Connors D, Gruskin E, Wu L, Mustoe TA (1996) Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: acute versus chronic hypoxia. *Wound Repair and Regeneration* 4 (2): 211-218.

Spector M (2006) Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. *Swiss Med Wkly* 136 (19-20): 293-301.

Stoffel M, Yi JH, Weichert D, Zhou B, Nebelung S, et al (2012) Bioreactor cultivation and remodelling simulation for cartilage replacement material. *Medical Engineering and Physics* 34 (1): 56-63.

Tare RS, Howard D, Pound JC, Roach HI, Oreffo RO (2005) Tissue engineering strategies for cartilage generation—micromass and three dimensional cultures using human chondrocytes and a continuous cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (2): 609-621.

Wendt D, Jakob M, Martin I (2005) Bioreactor-based engineering of osteochondral grafts: from model systems to tissue manufacturing. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (5): 489-494.

Whittaker RJ, Booth R, Dyson R, Bailey C, Parsons Chini L, et al (2009) Mathematical modelling of fibre-enhanced perfusion inside a tissue-engineering bioreactor. *Journal of Theoretical Biology* 256 (4): 533-546.

Wu J, Goosen MF (1995) Evaluation of the killing volume of gas bubbles in sparged animal cell culture bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology* 17 (12): 1036-1042.

Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* 22 (11): 1393-1398.

Ye H, Das DB, Triffitt JT, Cui Z (2006) Modelling nutrient transport in hollow fibre membrane bioreactors for growing three-dimensional bone tissue. *Journal of Membrane Science* 272 (1): 169-178.