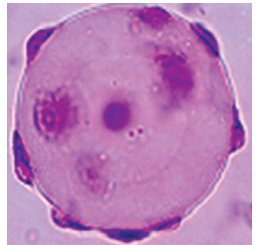


Superando los retos del cultivo de células animales a través de la bioingeniería

Laura A. Palomares, Norma A. Valdez-Cruz y Octavio Tonatiuh Ramírez

Hacia finales del siglo XIX se realizaron los primeros intentos en el mundo para aislar y mantener en cultivo células provenientes de órganos de diversos animales. Entre las técnicas iniciales que mejores resultados ofrecían se encontraba la dispersión de células en soluciones salinas o sueros sanguíneos, las cuales se hacían “colgar” en forma de gotas debajo de laminillas de vidrio. En un principio, el interés de los investigadores fue simplemente estudiar el comportamiento celular de forma independiente a posibles variaciones sistémicas del propio animal. Los retos originales fueron enormes y el desarrollo del campo progresó lentamente. Los grandes avances de entonces hoy serían juzgados logros muy modestos (mantener vivas las células por algunos días, por ejemplo). Gracias a un mejor entendimiento de la fisiología y metabolismo celular, a lo largo del siglo XX se desarrollaron mejores medios de cultivo y sistemas de propagación, por lo que, ya para los años cincuenta, el cultivo *in vitro* de células animales se constituyó como la tecnología más moderna

para producir diversas vacunas de uso humano. Con el advenimiento de la ingeniería genética y el desarrollo de la tecnología de hibridomas, a mediados de los años setenta, el cultivo de células animales se consolidó y convirtió en la vía por excelencia para producir anticuerpos monoclonales y un gran número de glicoproteínas recombinantes complejas usadas en terapia. Las aplicaciones del cultivo de células animales han seguido en aumento y actualmente abarcan campos tan fascinantes como el de trasplantes de órganos, terapias celulares, terapias génicas, toxicología y fisiología *in vitro*, análogos titulares, dispositivos bio-electromecánicos y nanobiotecnología. En este capítulo haremos una somera revisión sobre el cultivo de células animales, enfatizando los avances relevantes de la bioingeniería que la transformaron de una mera colección de procedimientos artesanales en una tecnología moderna basada en principios científicos. Se darán ejemplos de la contribución de nuestro grupo al campo durante las últimas dos décadas.



¿Qué son las células animales y para qué sirven?

Las células animales tienen varias características que las diferencian de otras células u organismos utilizados en la biotecnología. Son células de eucariotes superiores, por lo que poseen núcleo y diversos organelos, tales como retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Además, carecen de pared celular y son más grandes que las levaduras o bacterias, con un diámetro aproximado de entre 10 y 20 μm (figura 1).

Las diversas líneas celulares utilizadas en biotecnología poseen distintas características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas. Las células animales se pueden derivar de tejido epitelial, conectivo, muscular o nervioso. Generalmente crecen en forma de huso o poligonal, adheridas a una superficie y formando una monocapa durante su cultivo *in vitro* (dependencia al anclaje). Por el contrario, células derivadas del sistema hematopoyético, médula ósea o tejido linfóide, son independientes al anclaje, por lo que crecen suspendidas con forma esférica. Los cultivos primarios se generan directamente de células obtenidas de tejidos animales y tienen una vida finita, es decir, sólo se les puede mantener por cierto tiempo en cultivo. Sin embargo, se pueden obtener líneas celulares continuas mediante transformaciones que surgen espontáneamente durante el subcultivo o por inducción con ciertos virus o carcinógenos. Tales líneas continuas o transformadas son “inmortales”, ya que pueden mantenerse creciendo en cultivo indefinidamente. Es importante tomar en cuenta que las células animales provienen de organismos multicelulares y, en contraste con las bacterias o levaduras, han evolucionado para vivir en un ambiente altamente regulado por los varios sistemas que componen el cuerpo del que se originaron. Sin embargo, cuando las crecemos *in vitro*, las células están expuestas a ambientes cambiantes, pues carecen de los sistemas de regulación y protección presentes en el organismo completo, los cuales permiten entre otras cosas un abasto continuo y óptimo de nutrientes y eliminación de subproductos tóxicos.

A diferencia de eucariotes inferiores (hongos, levaduras) y bacterias, el cultivo de células animales representa retos enormes, ya que, entre otras características, las células animales son muy sensibles a estreses comúnmente encontrados en biorreactores, presentan requerimientos nutricionales complejos, crecen lentamente y sólo dentro de intervalos estrechos de variables como pH, temperatura y osmolaridad. Como resultado, los equipos, instalaciones y bioprocesos necesarios para cultivar células animales son sofisticados y costosos, ya que, entre otras cosas, requieren garantizar esterilidad absoluta a lo largo de la operación. Asimismo, las concentraciones máximas de células y de productos son muy bajas (en general varios órdenes de magnitud por debajo de aquellos obtenidos con bacterias y eucariotes inferiores) y, por ende, las productividades también son bajas. Todo esto explica el alto costo de los productos fabricados a través de esta tecnología.

¿Por qué entonces emplear células animales? Existen varias razones, entre las cuales la más importante es que son capaces de producir proteínas altamente parecidas a las que sintetiza el cuerpo humano, pues están más cerca evolutivamente que las bacterias o levaduras. Algunas proteínas humanas son muy grandes y son procesadas de distintas formas por las células que las producen. Estos procesamientos pueden ser complejos, como por ejemplo la glicosilación (adición de oligosacáridos a las proteínas, figura 2), y típicamente no suceden en levaduras o bacterias. Muchas proteínas requieren diversos procesamientos para ser funcionales en el cuerpo humano. Entre los ejemplos clásicos de estas proteínas se encuentran la eritropoyetina (utilizada en caso de anemia por disfunción renal), los factores VIII y IX (utilizados para el tratamiento de la hemofilia), el factor activador de plasminógeno (utilizado para la disolución de coágulos en problemas circulatorios) y los anticuerpos monoclonales (con una gama diversa de aplicaciones), entre otras. Es tal la importancia del cultivo de células animales, que aproximadamente la mitad de los más de 500 productos biofarmacéuticos que actualmente se encuentran en

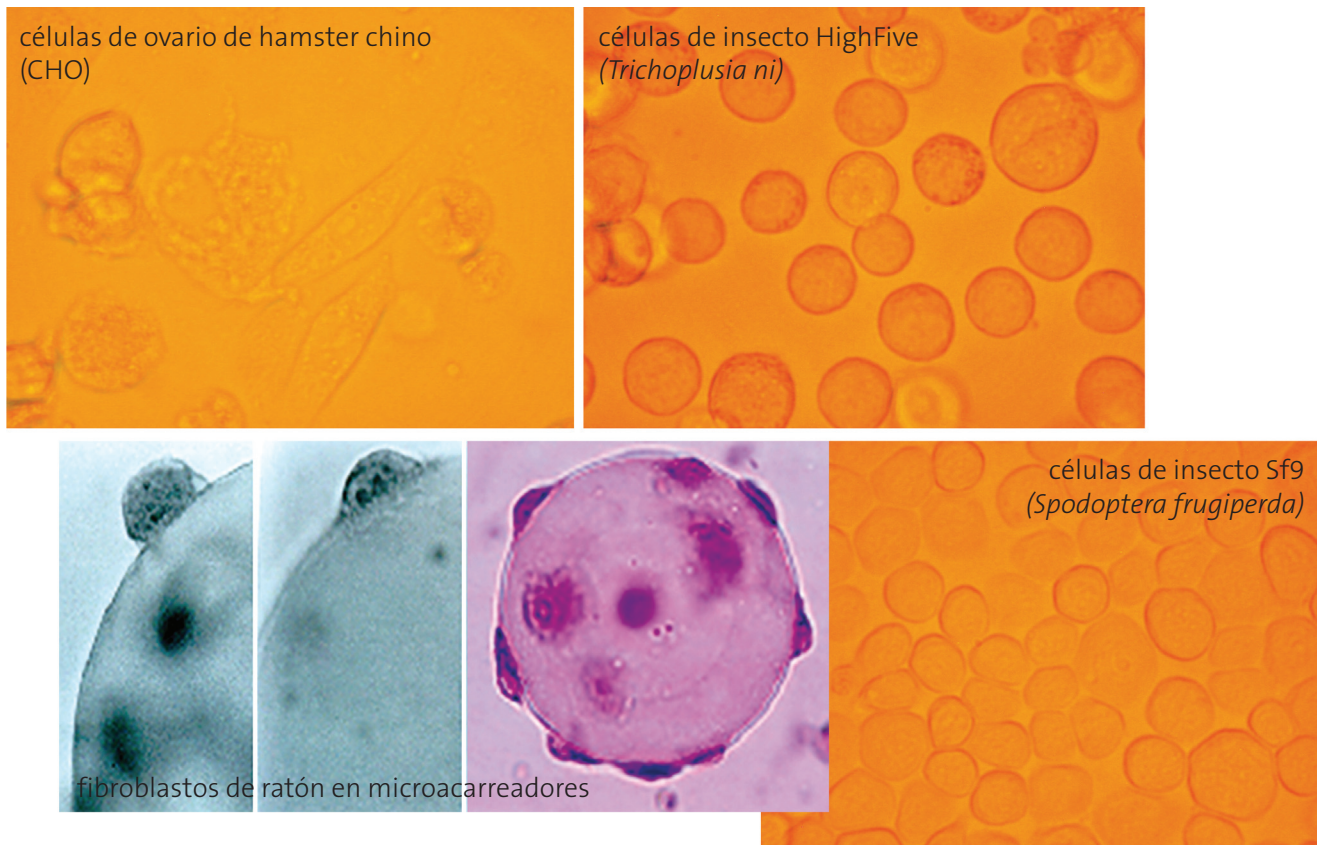


Figura 1.

Distintos tipos de células. Las de ovario de hámster chino crecen normalmente ancladas a superficie, tienen forma fibroblastoide y pueden adaptarse a crecer en suspensión, adquiriendo entonces forma esférica. Son las más utilizadas para la producción comercial de proteínas recombinantes mediante células animales. Una forma de cultivar células dependientes a anclaje en biorreactores agitados es utilizando microacarreadores. En la imagen también se muestran fibroblastos unidos a un microacarreador Cytodex3. En contraste con las células de mamífero, las de insecto crecen adheridas a superficie, pero en la mayoría de los casos conservan la forma esférica. Estas células se usan para la producción de bioinsecticidas y proteínas recombinantes (fotomicrografías de M. Barrón y C. Berdugo).

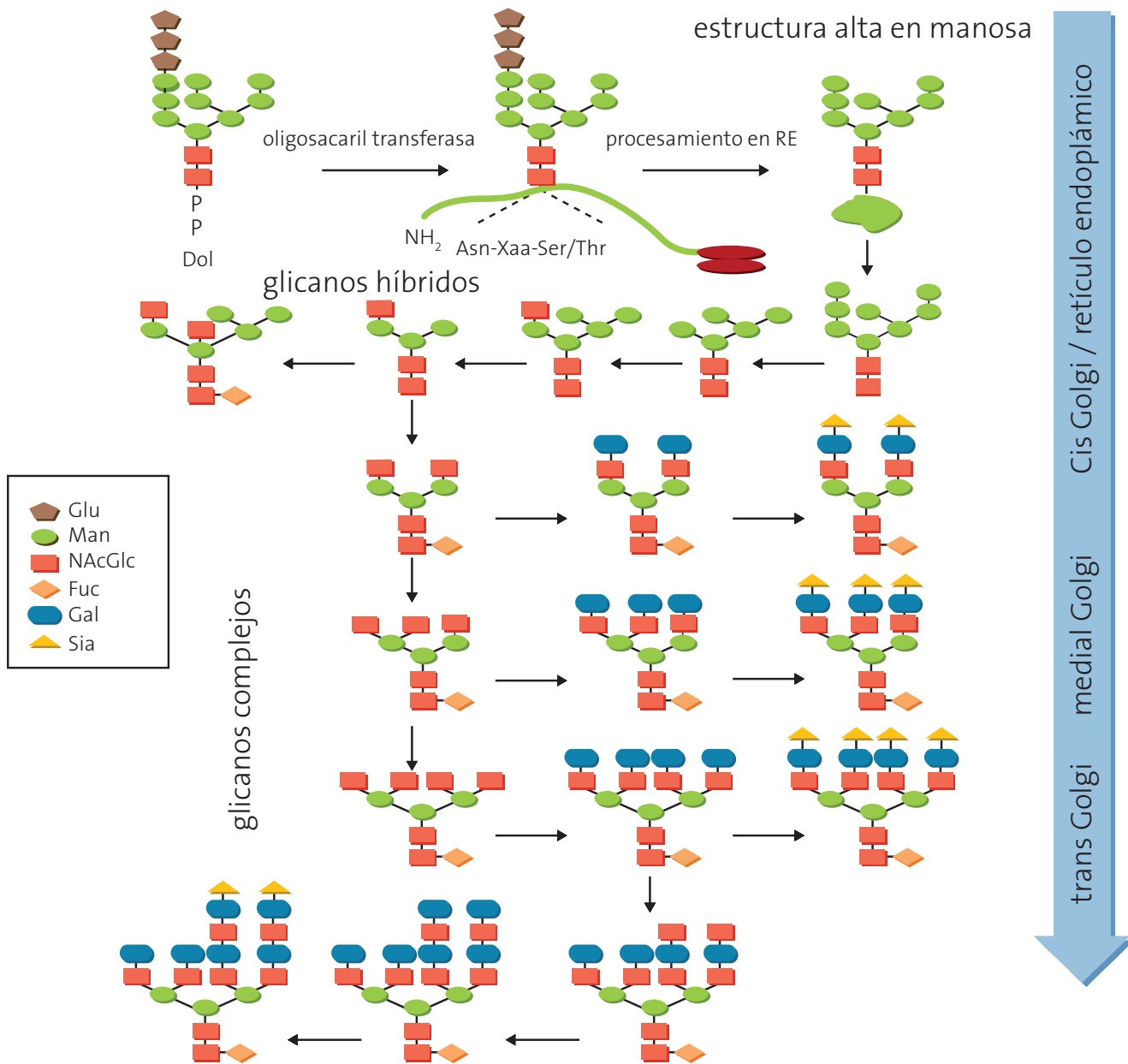


Figura 2. La ruta de N-glicosilación en mamíferos. Los primeros pasos (traducción, adición de los azúcares y plegamiento de la proteína) suceden en el retículo endoplásmico. Los azúcares se procesan hasta estructuras con 8 manosas, entonces la proteína es transportada al aparato de Golgi (para simplificar se ha omitido la proteína de los azúcares). En este aparato los azúcares son sometidos a la acción de varias enzimas exoglicosidasas (que cortan azúcares) y glicosiltransferasas (que transfieren azúcares). La glicosilación es una modificación postraduccional tan fina que difiere entre distintos organismos, etapas de vida, e incluso distintos órganos.

pruebas clínicas, requerirán ser producidos por esta tecnología.

En términos económicos, los productos derivados de células animales tienen actualmente un mercado de más de diez mil millones de dólares anuales, mientras que su impacto en el incremento de la calidad de vida y salud humana es incalculable.

Retos del cultivo de células animales

Gracias a soluciones emanadas de la bioingeniería, se han podido superar muchas limitaciones y problemas del cultivo de células animales, por lo que un número creciente de productos derivados de esta tecnología son ya una realidad.

A continuación se describen algunos de los problemas que han ocupado la atención de los bioingenieros, y en particular la de nuestro grupo, desde finales de los ochenta del siglo XX.

El estrés hidrodinámico

Debido a su mayor tamaño y ausencia de pared celular, las células animales son más sensibles al daño hidrodinámico que las bacterias o levaduras. Cuando se agita un biorreactor (equipo donde se efectúa un cultivo), como los usados actualmente para producir proteínas terapéuticas, se generan fuerzas, producto del movimiento del líquido, que pueden dañar las células. Además, burbujear aire al biorreactor, acción necesaria para abastecer a las células con el oxígeno requerido para satisfacer su metabolismo aerobio, provoca un daño mayor. Esto se debe a fenómenos interfaciales y a las fuerzas que se liberan cuando las burbujas estallan en la superficie del líquido. En los ochenta se desarrollaron biorreactores novedosos que evitaban el daño hidrodinámico, sin embargo, se trataba de sistemas muy intrincados, costosos y poco escalables. En esa época empezaron a utilizarse, de forma totalmente empírica, algunas sustancias que protegen a las células del estrés hidrodinámico. Entre éstas, se encontró que el compuesto Pluronic F-68, añadido en bajas concentraciones, era muy eficaz. Nuestros

estudios pioneros demostraron que el Pluronic F-68, molécula anfipática (que posee una fracción hidrofóbica y otra hidrofílica), se intercala en la membrana plasmática y reduce su fluidez, fortaleciendo la membrana plasmática, lo que permite a las células crecer en reactores agitados y burbujeados. Tales estudios, junto con los de muchos otros investigadores, permitieron entender los mecanismos que causaban el daño celular. Esto permitió cultivar células animales sin mayor problema en biorreactores tradicionales más sencillos y escalables, lográndose alcanzar escalas superiores a los 15 000 litros de volumen de operación. Más tarde, determinamos que el Pluronic F-68 también interfiere con algunas funciones celulares, como es la replicación de virus y la producción de proteínas recombinantes por el sistema de expresión transitoria constituido por células de insecto y baculovirus. Actualmente el Pluronic F-68 es un aditivo utilizado en prácticamente todos los medios de cultivo modernos para células animales. Nuestros trabajos han contribuido a entender su mecanismo de acción y, por tanto, la mejor forma de emplearlo.

La muerte celular programada

Una característica de las células animales es su capacidad de activar mecanismos de muerte, una especie de “suicidio” celular. Este fenómeno, conocido comúnmente como muerte celular programada o apoptosis, sucede en los organismos completos con el fin de definir su forma, regular el tamaño de órganos o contener un daño causado por agentes externos. La apoptosis consiste en mecanismos iniciados por la célula que resultan en su muerte. Un ejemplo es la formación de nuestros dedos, que en etapa fetal temprana están unidos por tejido que después desaparece como resultado de la muerte apoptótica. En otros casos, cuando la situación ambiental es adversa para la célula, ésta prefiere “suicidarse” por el bien común, por ejemplo cuando no hay suficiente oxígeno algunas células mueren por apoptosis, dejando el poco oxígeno disponible a otras células más importantes.

Otra forma de muerte es la necrosis, muerte pasiva inmediata al recibir un impacto externo. En este caso las células sufrirán un daño mecánico (se romperán) liberando su contenido al ambiente y provocando inflamación y daño al organismo. En la apoptosis el contenido celular no se libera al medio ambiente, se queda contenido en pequeñas estructuras (cuerpos apoptóticos) que después son fagocitadas por otras células (figura 3). Contrariamente a lo que se creía en un principio, la apoptosis también ocurre en biorreactores. En un cultivo celular, en contraste con el organismo completo, los cuerpos apoptóticos no son fagocitados, revientan en lo que se llama necrosis secundaria. La apoptosis debe ser tomada en cuenta en el diseño de procesos basados en células animales, pues, una vez iniciada, la célula está condenada a morir. Por lo tanto, perturbaciones al cultivo que disparen la apoptosis (elevación de temperatura, agotamiento de algún nutriente, disminución del pH, etc.) causan pérdidas sustanciales en la productividad.

La investigación mundial sobre este tema se ha enfocado en dos frentes principales: entender cuáles son las variables ambientales que disparan el proceso apoptótico (para evitarlas mediante mejores estrategias de control y operación de los cultivos) e identificar las cascadas de señalización y vías apoptóticas (con el fin de interferirlas a nivel molecular). Nuestro grupo ha trabajado en caracterizar el proceso apoptótico en células de insecto, hibridomas y células de hámster chino (CHO), e investigado el papel del estrés oxidativo (provocado por radicales libres) en la inducción de la apoptosis. Logramos controlar por primera vez el potencial redox (medida de las especies oxidantes o reductoras) en cultivos de células animales y encontramos las condiciones oxidantes que efectivamente inducen la apoptosis. Por otro lado, encontramos que las células de insecto son capaces de fagocitar cuerpos apoptóticos en cultivo, y que el agotamiento de nutrimentos clave como la glucosa induce la apoptosis. Además, también estudiamos si la reducción de temperatura en cultivos de células CHO reduce la apoptosis,

con un consecuente incremento en el tiempo de cultivo y, por lo tanto, en la producción de proteínas recombinantes. Las contribuciones de nuestro grupo en esta área, así como la de muchos otros bioingenieros en el mundo, han servido para establecer estrategias de cultivo novedosas que mejoran la productividad mediante el retraso o inhibición de la muerte celular programada.

Estrategias computarizadas de monitoreo y control

Entre las características de las células transformadas, como son la mayoría de las células animales utilizadas en biotecnología, está tener un metabolismo que “desperdicia” nutrientes. Estas células comúnmente consumen una alta cantidad de glucosa que convierten preferentemente en lactato en lugar de oxidarla completamente hasta bióxido de carbono para generar energía o utilizarla para biosíntesis de nuevas moléculas. Algo similar sucede con la glutamina, aminoácido que al ser utilizado libera amonio. Tanto el lactato como el amonio son subproductos tóxicos que normalmente son removidos de la célula por el torrente sanguíneo. Sin embargo, en cultivos *in vitro* permanecen en el sobrenadante y reducen la productividad, tanto por el ineficiente uso de los nutrientes como por su toxicidad. Una forma de evitar el desperdicio de nutrientes y la acumulación de sub-productos tóxicos es mantener los niveles de glucosa y glutamina muy bajos. De esta forma es posible controlar el metabolismo de la célula, promoviendo un consumo más eficiente de los esqueletos de carbono y reduciendo su despilfarro. Sin embargo, lograr mantener bajos los niveles de nutrientes, pero lo suficientemente altos para no disparar procesos apoptóticos, no es una tarea fácil, ya que las células están creciendo y la demanda de nutrientes cambia con el tiempo. Para evitar el despilfarro, hemos diseñado estrategias de control basadas en el monitoreo computarizado de biorreactores

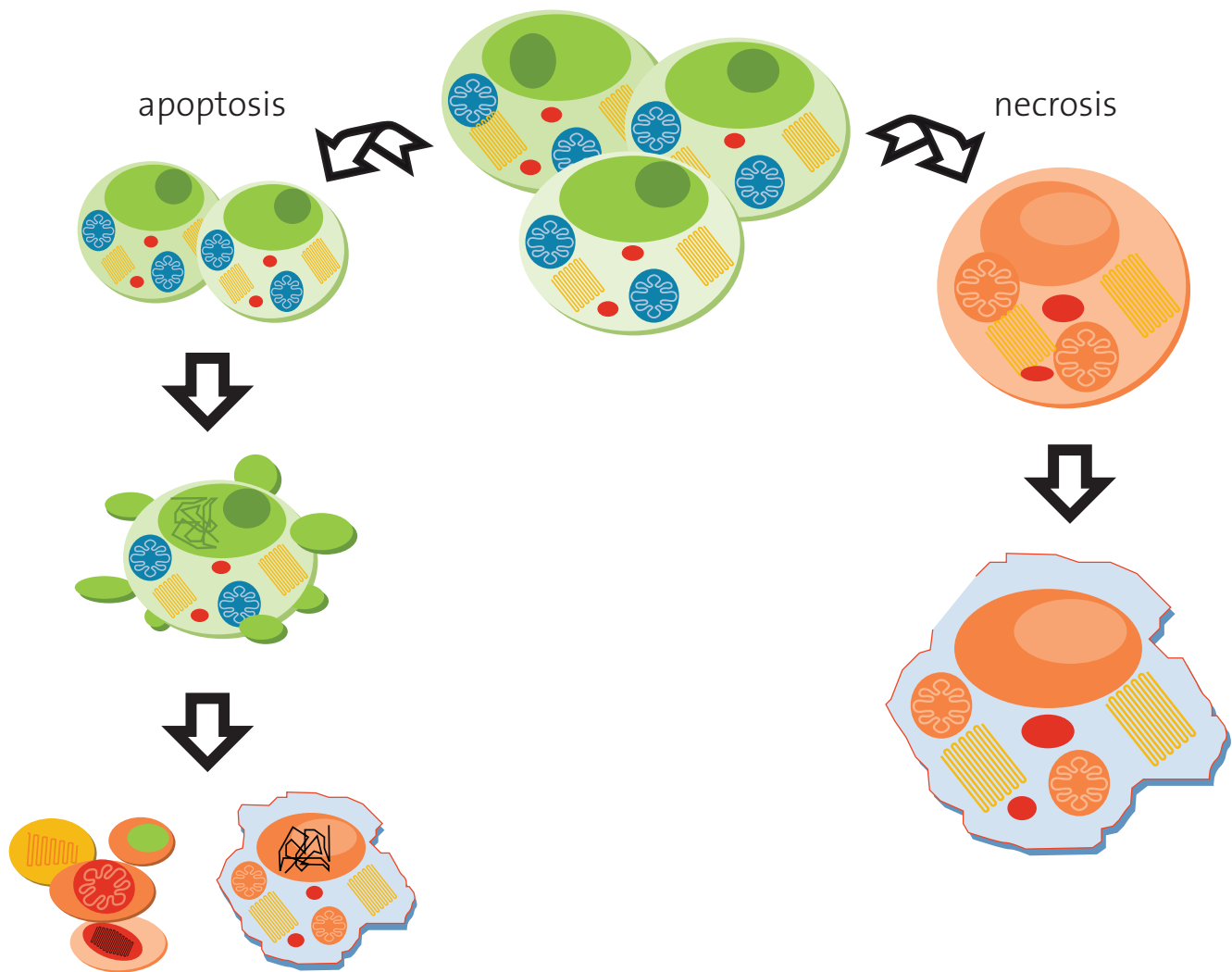


Figura 3. Características morfológicas de células en apoptosis o necrosis. En apoptosis primero ocurre una condensación de la cromatina, seguida por un hinchamiento de mitocondrias y formación de vesículas de citoplasma y organelos. Posteriormente, las vesículas son fagocitadas por otras células, o su contenido es liberado al medio de cultivo en el caso de cultivo *in vitro*. En la necrosis las células pierden la integridad de su membrana plasmática y se libera su contenido (esquema de A. Meneses).

instrumentados. En este caso identificamos variables que se pueden medir en tiempo real por medio de sensores adecuados. A través de algoritmos computacionales, la señal adquirida se convierte en variables que reflejan el estado metabólico de las células y, por medio de *actuadores*, se alimentan automáticamente los nutrientes en el tiempo y cantidades precisas. Estos sistemas nos permiten, además, monitorear en línea todo el proceso y controlar otras variables relevantes. La computadora es capaz de detectar un cambio en el metabolismo celular y tomar una acción en respuesta, por ejemplo, alimentar el nutriente que hace falta (**figura 4**). La variable que más utilizamos es la respiración celular, pues las células dejan de respirar en ausencia de nutrientes claves. Utilizando estas estrategias, hemos incrementado de forma importante la productividad de anticuerpos monoclonales (producidos por hibridomas) y de proteína recombinante (producida por células de insecto). Gracias al uso intensivo de sistemas modernos de computación, integrados a instrumentación analítica cada vez más avanzada, y sofisticados algoritmos de adquisición y control de datos, el cultivo de células animales ha experimentado un avance significativo en las últimas dos décadas.

El cultivo de células animales a gran escala: ambientes heterogéneos

La producción de medicamentos requiere cultivos en biorreactores de grandes volúmenes; en el caso de células animales, de miles de litros. Dado el gran tamaño de estos tanques, es muy complicado mantenerlos homogéneos y lograr transferir suficiente oxígeno sin causar daño hidrodinámico (**figura 5**). Debido a esta limitación, es común que las células se vean expuestas a ambientes fluctuantes, donde pueden experimentar cambios continuos en el oxígeno disuelto, pH, concentración de dióxido de carbono (producto de la respiración), nutrientes (si estos son alimentados), temperatura, etc. A pesar de la creciente necesidad de

cultivar células animales en tanques de gran tamaño, se conoce muy poco sobre los efectos que estas condiciones cambiantes pueden tener en las células. El escalamiento descendente es un acercamiento eficaz propuesto por la bioingeniería para entender los efectos de las condiciones de gran escala sobre las células y sus productos, sin necesidad de experimentar en las condiciones y escalas reales, algo que resultaría impráctico. Un aspecto central del escalamiento descendente es el desarrollo de sistemas (simuladores) en los que es posible emular las condiciones fluctuantes presentes en biorreactores industriales.

En nuestro grupo, mediante diseños y estrategias de control computarizadas novedosas, hemos construido simuladores que permiten reproducir fluctuaciones ambientales altamente dinámicas. Así, hemos determinado que gradientes de oxígeno disuelto no afectan la concentración de anticuerpo monoclonal producido por hibridomas, pero sí perjudican su patrón de glicosilación. Los anticuerpos tienen oligosacáridos unidos covalentemente a ciertas secuencias consenso de las cadenas peptídicas (glicosilación), que pueden ser muy diversos dependiendo de la célula que los producen. Estos azúcares son críticos para que los anticuerpos sean capaces de desencadenar la respuesta inmune celular que debe suceder cuando un anticuerpo encuentra a su antígeno (respuesta efectora). Los anticuerpos producidos por hibridomas sometidos a condiciones cambiantes de oxígeno disuelto pueden contener azúcares poco comunes, lo que se sabe afecta su función. Hemos demostrado que no sólo la cantidad de proteína es importante, sino también su calidad, evaluada como el patrón de glicosilación. Cambios intermitentes en otras variables ambientales pueden también tener efectos substanciales sobre la calidad y cantidad de proteína producida, así como sobre la fisiología celular. De tal forma que varios grupos en el mundo, incluido el nuestro, emplean el escalamiento descendente como herramienta para mejorar el proceso del escalamiento ascendente.

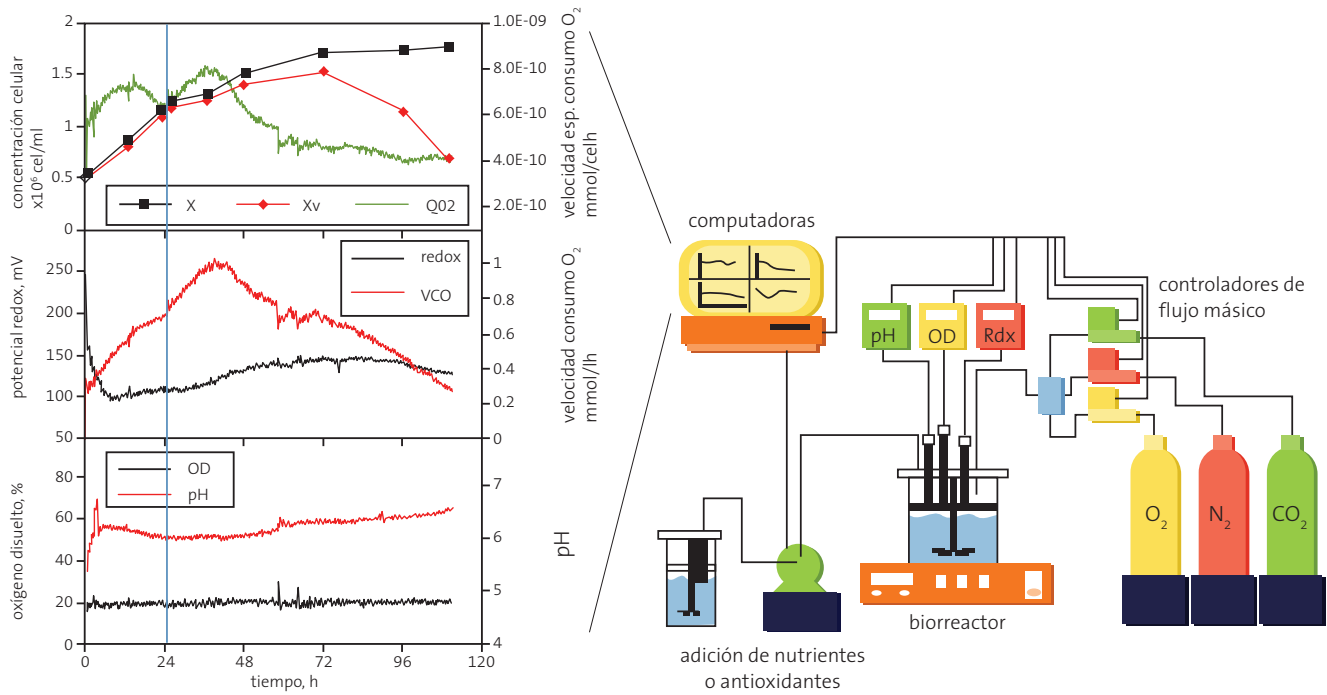


Figura 4.

Sistema de control y adquisición de datos desarrollado por el grupo. Por medio de controladores de flujo másico, el sistema es capaz de abastecer al reactor una corriente gaseosa de composición conocida. Además, se adquieren los valores de pH, oxígeno disuelto (OD), potencial redox, y dióxido de carbono disuelto (datos no mostrados). El sistema permite mantener todos estos parámetros constantes en un valor predeterminado, o variando también con un valor predeterminado. Se muestran datos típicos de un perfil predeterminado. La línea punteada indica el momento de infección. En este sistema es posible calcular la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) del cultivo, y utilizarla como herramienta de monitoreo y control del cultivo. En el primer panel es posible ver como aumenta la velocidad específica de consumo de oxígeno (QO_2) después de la infección (datos experimentales de A. Rodríguez y P. Mondragón).

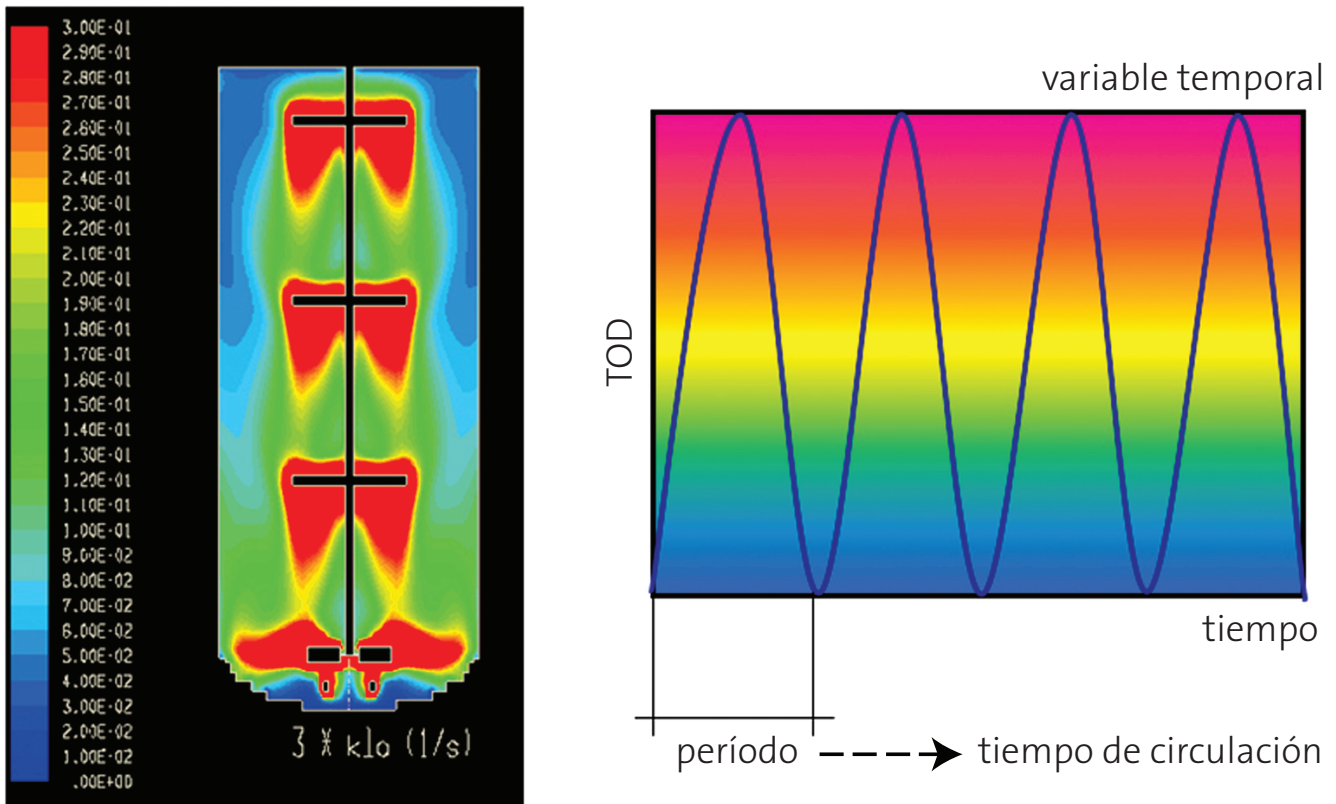
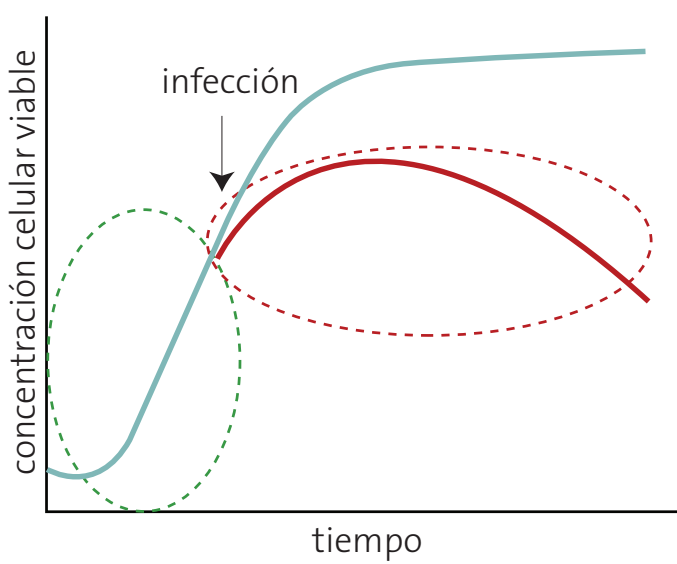


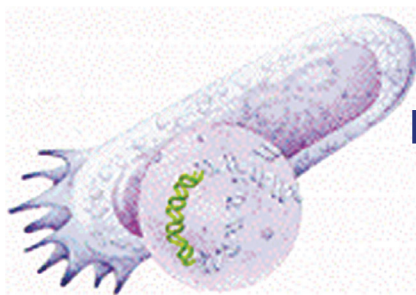
Figura 5. Una simulación computacional (reproducida con autorización de Bakker, A., 2003, The Colorful Fluid Mixing Gallery, <http://www.bakker.org/cfm>) muestra la distribución de coeficientes de transferencia de masa en un reactor agitado. Dichas diferencias en el coeficiente de transferencia pueden resultar en gradientes de gases en el fermentador, como el oxígeno o el dióxido de carbono disueltos. Reprodujimos dichos gradientes manteniendo con nuestro sistema de control un perfil sinusoidal como el mostrado a la derecha (figura de J. A. Serrato), simulando los cambios en el oxígeno disuelto que una célula experimentaría al viajar en el reactor.



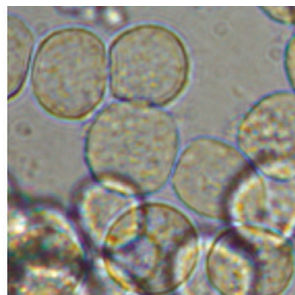
cultivo no infectado
crecimiento exponencial
ciclo celular activo
tamaño celular definido

cultivo infectado
sin crecimiento-con daño celular
ciclo celular detenido
aumento de tamaño celular
aumento de la respiración
aumento en consumo de nutrientes

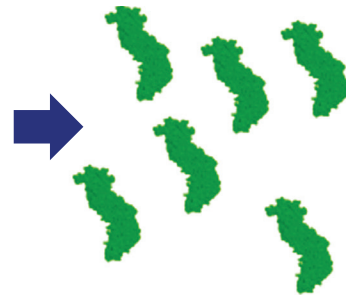
sistema células de insecto baculovirus



baculovirus recombinante



células de insecto



proteína recombinante

Figura 6.

Arriba se muestra el efecto de la infección de un virus: el cultivo deja de crecer y disminuye su viabilidad en corto tiempo. Abajo un sistema de infección donde un baculovirus recombinante, que contiene el gene de interés bajo uno de los promotores más fuertes que se conocen, se adiciona a un cultivo de células de insecto, su huésped natural. Las células infectadas producen la proteína recombinante.

Bioprocesos que involucran virus

La producción de virus para vacunas fue la primera razón por la que se cultivaron células animales a gran escala. Actualmente se utilizan procesos con virus para la producción de proteínas recombinantes, para terapia génica, o para nanotecnología. La producción de virus es compleja, ya que es un proceso de dos etapas (figura 6). Primero, las células son cultivadas hasta que alcanzan una concentración determinada, y después son infectadas con el virus en cuestión. La síntesis de proteínas y material genético viral comienza y se eleva a expensas de la célula infectada, cuyas funciones biosintéticas propias se reducen o cesan completamente. Por lo tanto, las condiciones de la célula antes y después de la infección son muy distintas. Entre otras cosas, las células infectadas ya no crecen después de ser infectadas y morirán, liberando en general enzimas degradativas que perjudican al producto de interés. Por esto los bioprocesos que utilizan virus requieren un cuidadoso diseño de estrategias de infección, que incluyen la dosis de virus que se adicionará al cultivo, la concentración celular a la que se realiza la infección y los tiempos adecuados de cosecha.

Nuestro grupo utiliza el sistema células de insecto-baculovirus (figura 6) para la producción simultánea de varias proteínas recombinantes, que después se ensamblan para producir partículas idénticas al virus nativo, pero sin material genético (pseudopartículas virales, PPV). Específicamente, producimos PPV de rotavirus, un virus que causa diarreas en crías de distintas especies. Las PPV de rotavirus son esféricas con tres capas formadas por cuatro proteínas. Se pueden utilizar como vacunas sin peligro de que pudieran ocasionar alguna enfermedad. Además, ya que están vacías, se pueden encapsular sustancias en su interior y transportarlas a algún sitio donde no puedan llegar solas. Trabajamos, además, con vectores de virus adenoasociados. Estos vectores se utilizan para transportar ADN a algún organismo donde haga falta, en lo que se conoce como *terapia génica*. Un ejemplo del uso de la terapia

génica puede darse con la diabetes: algunos pacientes diabéticos han perdido la capacidad de producir insulina, por lo que deben inyectársela diariamente. Por medio de la terapia génica, se ha logrado introducir el gene de la insulina en células del cuerpo, las cuales adquieren la capacidad de producirla. De esta forma, el paciente diabético ya no requeriría inyecciones de insulina, pues su cuerpo ya la produce. La producción de vectores para terapia génica no sólo requiere la producción de las proteínas virales, sino también del ADN que será entregado a la célula de interés. Este ADN debe ser empaquetado dentro de la cápside viral.

Para la producción de PPV o vectores para terapia génica, se requiere la presencia simultánea de varias proteínas recombinantes y del ADN del vector. Lograr esto constituye un reto. De hecho, el proceso actual es bastante ineficiente, con menos del 5% de las proteínas ensambladas en PPV o vectores. Lograr la producción y encapsidación del ADN viral es otro reto. Hemos estudiado a profundidad el proceso de ensamblaje de PPV, así como su cuantificación y purificación, con la finalidad de diseñar estrategias racionales de producción. Gracias a esto, ha aumentado de forma importante la cantidad de proteína ensamblada y, por lo tanto, el rendimiento. Actualmente exploramos el uso de estas proteínas virales como nanomateriales, dadas sus características de tamaño y forma. Un ejemplo es la funcionalización de nanotubos formados por proteínas de la cápside de rotavirus, mediante la deposición específica de distintos metales. Es interesante notar cómo la producción de virus, una de las primeras aplicaciones de la tecnología de células animales, ha adquirido sesgos muy novedosos y está siendo el cimiento de las aplicaciones futuras de este campo.

Cultivo de tejidos

La producción de tejidos humanos usados en diversas terapias celulares es otra muestra fascinante de las aplicaciones de la tecnología de cultivo de células animales. La reconstitución

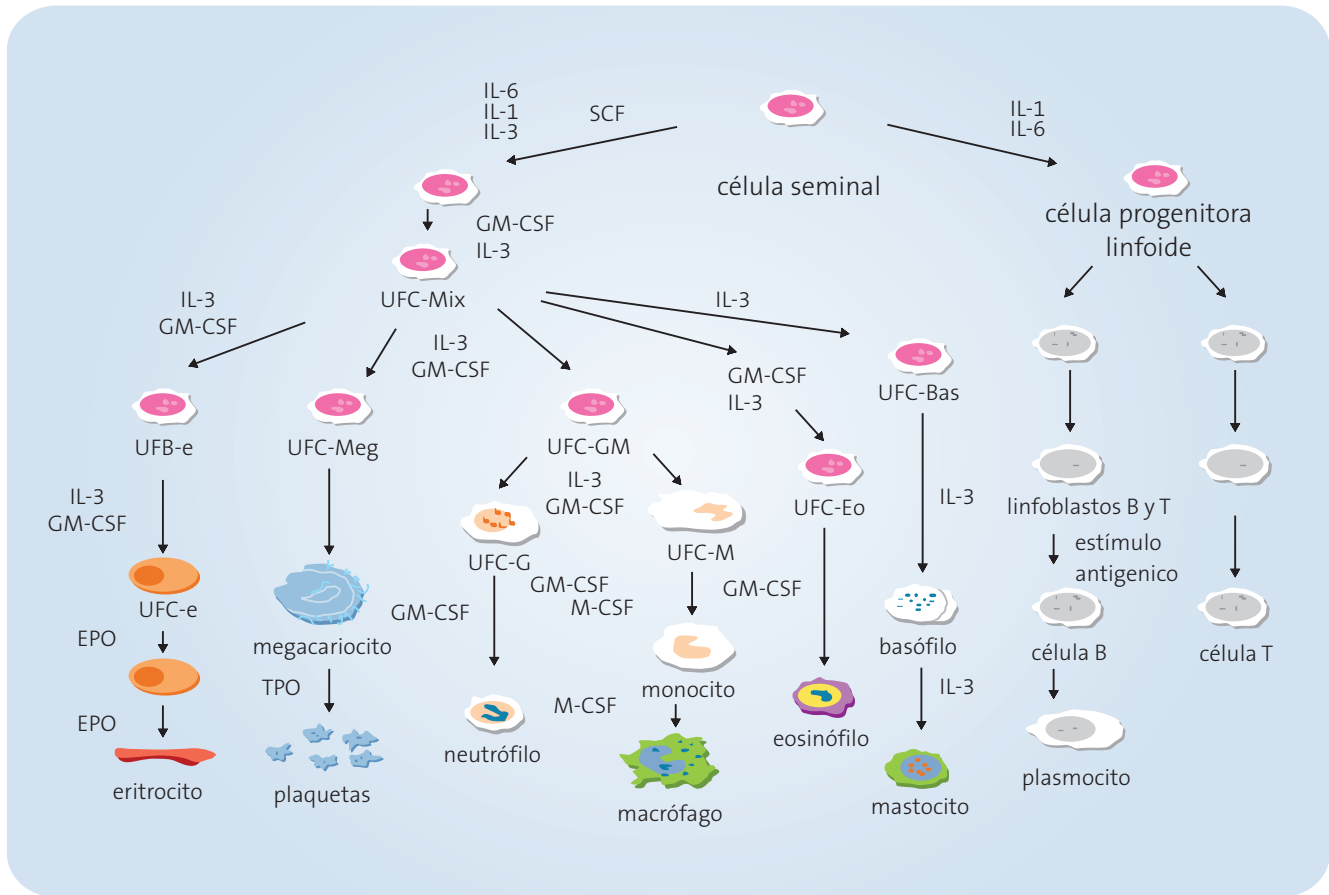


Figura 7. Cascada hematopoyética que origina todas las células de la sangre. El reto de la bioingeniería es emular en un biorreactor este delicado despliegue de proliferación y diferenciación celular (esquema de E. López-Chalini).

de órganos y tejidos es de gran complejidad, ya que en muchas ocasiones se trata de cultivos de poblaciones celulares de diversos tipos y etapas de diferenciación, las cuales interactúan entre sí para formar estructuras tridimensionales intrincadas. Un ejemplo de bioprocesos en el área de cultivo de tejidos, en el que nuestro grupo ha participado, es la expansión de células hematopoyéticas humanas de sangre de cordón umbilical (**figura 7**). La reconstitución *in vitro* del sistema hematopoyético es de gran utilidad clínica, ya que es una opción terapéutica para una variedad de padecimientos, además de tener gran potencial para aplicaciones en terapia génica. La cascada de diferenciación y proliferación de una célula progenitora hematopoyética, necesaria para generar las diversas poblaciones de células sanguíneas maduras, es un complicado proceso en el que participan una gran cantidad de factores tanto humorales como celulares, por lo que reproducir tal sistema en un biorreactor constituye un verdadero reto que está siendo superado por la bioingeniería. Además de este tejido, actualmente es posible producir *in vitro* otros tejidos funcionales, tales como piel, hueso, cartílago, hígado, venas y arterias. La producción de tejidos por cultivo reúne retos únicos de manufactura, como: consideraciones de esterilidad en productos no esterilizables; lotes únicos, pequeños, específicos al paciente y requeridos sobre demanda en tiempos extremadamente cortos; y participación de médicos, pacientes y hospitales en el proceso de fabricación. Todo esto hace del cultivo de tejidos un campo que está definiendo nuevos paradigmas para el cultivo de células animales.

Conclusiones

Esperamos en esta reseña haber abierto una puerta al mundo del cultivo de células animales, quedando aún mucho por describir de esta compleja tecnología. El conocimiento generado en este campo puede ser utilizado para el diseño de estrategias de producción racionales, cuyo objetivo principal es incrementar el rendimiento de los procesos que utilizan estas células. La finalidad última es generar productos, seguros y eficaces, que mejoren la salud y calidad de vida y que sean accesibles a la mayor parte de la sociedad. ●

Agradecimientos

Agradecemos a Vanessa Hernández y Karin Levy su apoyo continuo, y a todos los miembros del grupo, pasados y actuales.

Bibliografía

- Palomares, L. A. y O. T. Ramírez, "El sistema de células de insecto-baculovirus: una alternativa poderosa para la producción de pseudo-partículas virales y otras proteínas recombinantes", en *BioTecnología*, 6, 2001.
- Ramírez, O. T., "Alternativas para contender con el problema de la toxicidad del amonio en cultivos de células de eucariotes superiores", en *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*, E. Galindo (ed.), Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, 1996.
- _____, "Nuevos bioprocesos", en *Fronteras de la biología en los inicios del siglo XXI/Ingeniería celular: biodiversidad e industria*, F. Bolívar y A. López-Munguía (eds.), El Colegio Nacional, 2003.
- _____, "Ingeniería bioquímica", en *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*, F. Bolívar (ed.), El Colegio Nacional, 2004.
- Ramírez, O. T. y J. Uribe de la Mora, "Biotecnología farmacéutica moderna en México: el caso de Probiomed S.A. de C.V.", en *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*, F. Bolívar (ed.), El Colegio Nacional, 2004.

