

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

**“Diseño de un biorreactor tipo lote alimentado
en un sistema tubular de tanque agitado para el
crecimiento de eritroides libres de patógenos en
suspensión”**

MEMORIA DE TRABAJO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

I N G E N I E R O Q U Í M I C O

Presenta:

Sandro Guadalupe Pérez Grajales

ASESOR EXTERNO: DR. JOSÉ SANTOS ÁNGELES CHIMAL
ASESOR INTERNO: IQ. BORIS JIMÉNEZ BARRERA

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vi
Nomenclatura	vi
Agradecimientos	viii
Dedicatorias	ix
CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Cinéticas	2
1.1.1 Cinéticas del crecimiento microbiano	3
1.1.2 Cinética del sustrato	7
1.1.3 Cinética del producto	8
1.2 Reactores ideales (ecuaciones de diseño)	8
1.3 Cultivos y fermentaciones	9
1.4 Diseño de biorreactor tipo lote alimentado (feed batch)	10
1.5 Fenómeno de transferencia de oxígeno en la célula a partir de burbujas de aire	11
1.6 Reactor de flujo pistón	13

1.6.1 Reactor tubular	16
1.6.2 Reactor de flujo pistón	18
CAPITULO 2	
ANTECEDENTES	19
2.1 la sangre: regulador homeostático	19
2.2 La hematopoyesis	20
2.2.1Concepto de célula madre hematopoyética	20
2.2.2 Progenitores hematopoyéticos	21
2.2.3 Eritropoyesis	22
2.2.4 Células ltc-ic	22
2.2.5 Marcadores de selección	23
2.3 Microambiente hematopoyético	25
2.3.1 Factores estimuladores de la hematopoyesis	25
2.3.2 Interleucinas	26
2.3.3 Factores estimuladores de colonias y otros factores	27
2.4 Aplicaciones terapéuticas de las células hematopoyéticas	27
2.5 Fuentes de células hematopoyéticas	28
2.5.1 Células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical	29
2.6 Expansión de células hematopoyéticas	31

2.6.1 Expansión <i>in vitro</i> en cultivos estáticos	31
2.6.2 Cultivos en biorreactor	32
CAPITULO 3 JUSTIFICACIÓN	34
CAPITULO 4 OBJETIVOS	36
CAPITULO 5 METODOLOGÍA	37
CAPITULO 6 PROPUESTA DEL BIORREACTOR.	41
CAPITULO 7 RECOMENDACIONES	52
CAPITULO 8 CONCLUSIONES	53
CAPITULO 9 REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Clasificación de los reactores por su funcionamiento.	2
1.2	Reactor tipo air-lift	2
1.3	Modelo de Monod.	5
1.4	Determinación de los parámetros cinéticos.	6
1.5	Fases de cultivo en un biorreactor tipo lote alimentado	11
2.1	Esquema general de la hematopoyesis.	24
2.2	Algoritmo para la obtención y procesamiento de la muestra Sección transversal de la propuesta del reactor tanque	38
2.3	agitado	42
2.4	Sección transversal del reactor interior	43
2.5	Feed batch con alimentación constante	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Características de las fases de un cultivo	10
2.1	Propiedades fisicoquímicas de la sangre	19
2.2	Las células de la sangre y sus funciones. El grupo de los leucocitos está formado por linfocitos, monocito, células NK y granulocitos	20
2.3	Estimación de la velocidad de producción celular in vivo	20
2.4	Componentes propios y asociados de la matriz extracelular	25
2.5	Características funcionales de diferentes factores hematopoyéticos	26
2.6	Características de las fuentes disponibles de células hematopoyéticas humanas	30
2.7	Evaluación de las características de biorreactores	32
2.8	Ventajas y desventajas dependiendo el tipo de biorreactor	33
2.9	Reportes de generación de precursores neurales con medios adicionados con sueros.	37

NOMENCLATURA

CFC	Células formadoras de colonias	
CL	Concentración de oxígeno en medio de cultivo	(mg O ₂ /L
CMH	Célula madre hematopoyética	
CMN	Células mononucleares	
CSF	Factor estimulador de colonias	
E-	Eritroides	
Epo	Eritropoyetina	
Est	Estroma	
<i>f</i>	Factor de recambio	
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	
Flt-3	Ligando del receptor Flt-3	
G-	Granulocitos	
GEMM-	Granulocitos-Eritroides-Macrófagos-Megacariocitos	
GM-	Granulocitos--Macrófagos	
HC	Hormona de crecimiento	
IFN-γ	Interferón gamma	
IL-x	Interleucina-x	
IMDM	Medio de Dulbecco modificado por Iscove	
k _L a	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	
LTC-IC	Células iniciadoras de cultivo a largo plazo	
MTC	Medio MethoCult GF H4434 (StemCell)	
Np	Número de potencia	(-)
Pla	Placenta	
PRC	Potencial redox de cultivo	mV
qo ₂	Velocidad específica de consumo de oxígeno	(mg O ₂ /cel*h)
SCF	Factor de células seminales	
SCU	Sangre de cordón umbilical	
SFB	Suero fetal de bovino	
t	Tiempo	
Td	Tiempo muerto	
tm	Tiempo de mezclado	s
TOD	Tensión de oxígeno disuelto	%
Tpo	Trombopoyetina	
UFC	Unidades formadoras de colonias	
V	Volumen	mL
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno	μm O ₂ /h
μ	Velocidad específica de crecimiento	d-1,h-1

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Químicas y al Centro Estatal de transfusión Sanguínea, por el apoyo que me brindaron para la realización de ésta memoria de trabajo.

A mis asesores:

Dr. en C. José Santos Ángeles Chimal y al M. en C. Boris Jiménez Barrera, por el tiempo que me brindaron en la realización de mi trabajo.

DEDICATORIAS

A mis abuelitos maternos y paternos:

Sr. Arturo Grajales Ramos†
Sra. Isabel Mayén Ruíz†
Sr. Arnulfo Pérez González†
Sra. Reyna Ruiz Velázco†

A mis padres:

Mayor de infantería Víctor Manuel Pérez Valente
C.P. Esther Grajales Mayén
Por su apoyo incondicional y consejos que me dieron, antes,
durante y después de mi formación profesional.

En especial a mi tío-papá:

C.P. José Arturo Grajales Mayén
Por estar siempre a mi lado en los momentos importantes de mi vida.

A mi ex esposa

I.Q. Teresa Hernández Ortiz
Quien con sus agudas críticas me impulsó a lograr este que es
por ahora, mi principal objetivo.

A mi hija:

Aylen Ittahi Esther Isabel Pérez Hernández
Que con su alegría y menos de una década de vida, me ha dado
fuerza para lograr mis metas.

A mis suegros y cuñada:

Sr. Felipe Hernández Medina

Sra. Febita Ortiz Rodríguez

M. en C. Magdalena Hernández Ortiz

Por sus consejos y apoyo incondicional que siempre me han brindado, pero en especial a mi suegro que un día me dijo..."Si quieres triunfar en la vida, recuerda que el mundo es de los audaces".



CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Los reactores biológicos o biorreactores surgen de la necesidad de desarrollar productos biotecnológicos para el beneficio del ser humano. Actualmente el área que involucra a los biorreactores es la Bioingeniería y diversas áreas, por lo que el tópico de biorreactores se ha convertido en un área multidisciplinaria y que en el caso particular de Ingeniería Química una importante oportunidad de desarrollo en la actualidad.

Los Reactores biológicos o Biorreactores por su carácter biológico se pueden agrupar en dos tipos principalmente, los cuales son:

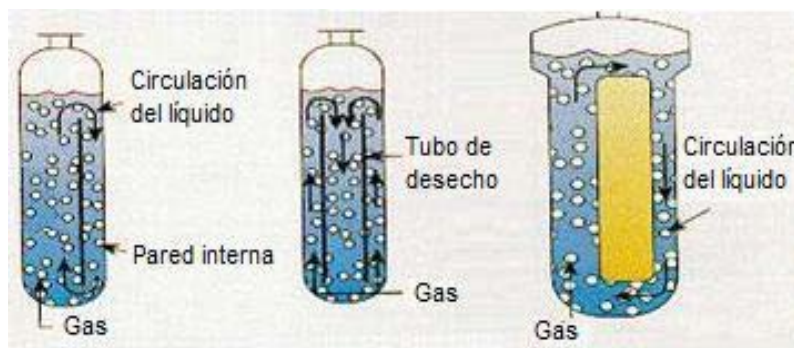
- **Fermentadores.** El proceso es realizado por organismos vivos (microorganismos, células vegetales y animales) o partes de ellos (como tejidos).
- **Reactores Enzimáticos.** El proceso se realiza en un reactor químico sólo que a diferencia de este el catalizador es una enzima (proteína con actividad biológica).

Por su funcionamiento ó tipo de agitación (**Figura 1.1.**), los reactores pueden clasificarse como:

- **Agitados mecánicamente.** La agitación se lleva a cabo con la propulsión proporcionada por un agitador mecánico y un motor.
- **Agitados neumáticamente.** En este tipo de reactores la agitación se lleva a cabo por un flujo de aire dentro del reactor. Este tipo de agitación se emplea en cultivos aerobios, con una alta demanda de oxígeno.



(A)



(B)

Figura 1.1. Clasificación de los reactores por su funcionamiento ó agitación. (A) Mecánica y (B) neumática

En los reactores biológicos existe un tipo especial de reactor denominado air-lift (**Figura 1.2.**), donde además de ser agitado neumáticamente se colocan mamparas para aumentar la turbulencia y recirculación, mejorando considerablemente el proceso, como se muestra a continuación.



Figura 1.2. Reactor tipo air-lift



1.1 CINÉTICAS

Para el diseño y operación de reactores químicos, la cinética química y catálisis es importante. En el caso de reactores biológicos, esto no es la excepción. Sin embargo, obedecen a cinéticas especiales para el crecimiento microbiano y se generalizan para organismos superiores; así como también para el caso de las reacciones catalizadas enzimáticamente, siguiendo analogías a expresiones de velocidad o isothermas como la de Langmiur (Aiba,1973).

1.1.1 CINÉTICAS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

Para el caso del crecimiento celular o generación de biomasa, se toma como base que los microorganismos se duplican, por lo que podría plantearse un modelo cuya tasa de crecimiento es de 2^n . Lo cual resulta inmediato pero no suficiente para el propósito del diseño de un reactor, ya que es difícil de cuantificar un balance de masa. Por lo cual se propone un modelo diferencial de primer orden para el crecimiento, como se muestra a continuación (Aiba, 1973):

Ec (1)

$$\frac{dN}{dt} = KN$$

Donde:

N = población de microorganismos = No. org/mL

t = tiempo (horas)

k = constante cinética (h^{-1})

Sin embargo, este modelo resulta aún poco práctico para balances de masa, por lo cual se introduce una nueva variable X que es la concentración de biomasa en base seca, esto debido a que el mayor porcentaje en peso de los seres vivos es agua y esto interfiere con los balances (Aiba,1973), así:

Ec (2)

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



Donde:

X = Biomasa = g de biomasa / L

t = tiempo (horas)

μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

La velocidad específica de crecimiento se representa con la letra griega μ , la cual es la constante cinética que representa la tasa de crecimiento de los microorganismos. Entre más grande sea el valor el microorganismo crecerá más con respecto a otros y viceversa.

Otro parámetro importante para la caracterización cinética de los microorganismos, es el tiempo de duplicación. Es el tiempo que tarda un microorganismo en duplicarse. Al igual que la velocidad específica de crecimiento, la cual está en función del tipo del microorganismo, temperatura, sustrato, entre otras. Así el tiempo de duplicación se determina según la siguiente ecuación (Aiba,1973):

Ec (3)

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

Se acomoda y se integra según los límites cuando $t = 0$ $X = X_0$ y
cuando $t = t_d$ (tiempo de duplicación) $X = 2X_0$



$$\int_{X_o}^{2X_o} \frac{dX}{X} = \mu \int_0^{td} dt$$
$$\ln \frac{2X_o}{X_o} = \mu td$$

Llegando a:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Influencia de la concentración de sustrato en la velocidad específica de crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento puede presentar una funcionalidad con respecto a la concentración de sustrato, según lo presentado por la ecuación de Monod. Cabe mencionar que no siempre los organismos seguirán este modelo, ya que esto está determinado por cuestiones metabólicas. El modelo de Monod análogo del de Michaelis- Menten para enzimas es el siguiente (Aiba,1973):

Ec (4)

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

Donde:

$\mu_{\max}$ = velocidad máxima de crecimiento (h^{-1})

K_s = Cte. De afinidad del organismo por el sustrato
(g/L)

Este modelo (**Figura 1.3.**) se representa gráficamente según lo siguiente:

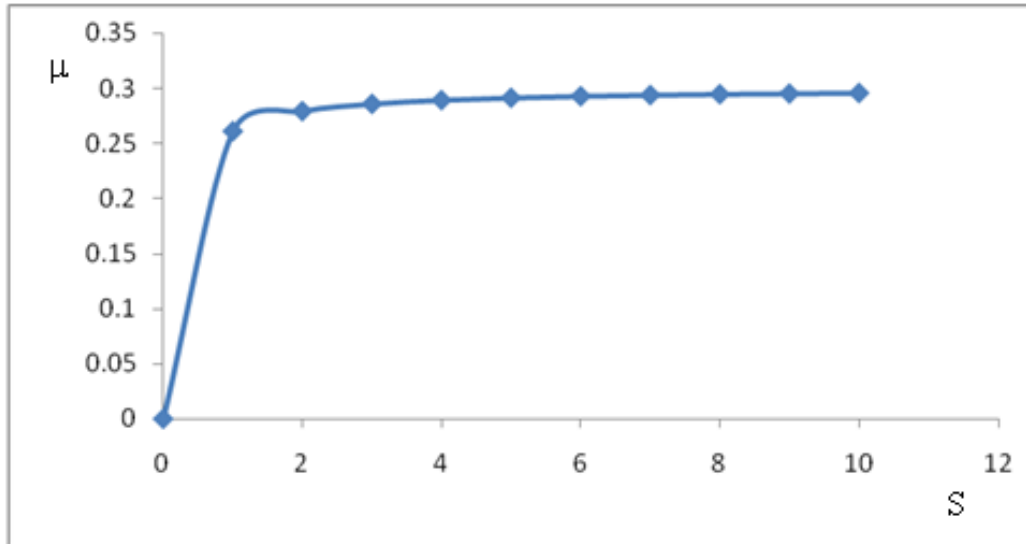


Figura 1.3. Cinética de crecimiento de acuerdo al Modelo de Monod.

Para determinar los parámetros cinéticos $\mu_{\max}$ y K_s (**Figura 1.4.**), se obtiene el inverso de la ecuación, y así se lineariza la misma (Aiba,1973).:

Ec (5)

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}}$$

Graficando $1/\mu$ vs. $1/S$, la pendiente de la recta es $K_s/\mu_{\max}$, la ordenada al origen $1/\mu_{\max}$ y la abscisa al origen $-1/K_s$, según lo siguiente (Aiba,1973).:

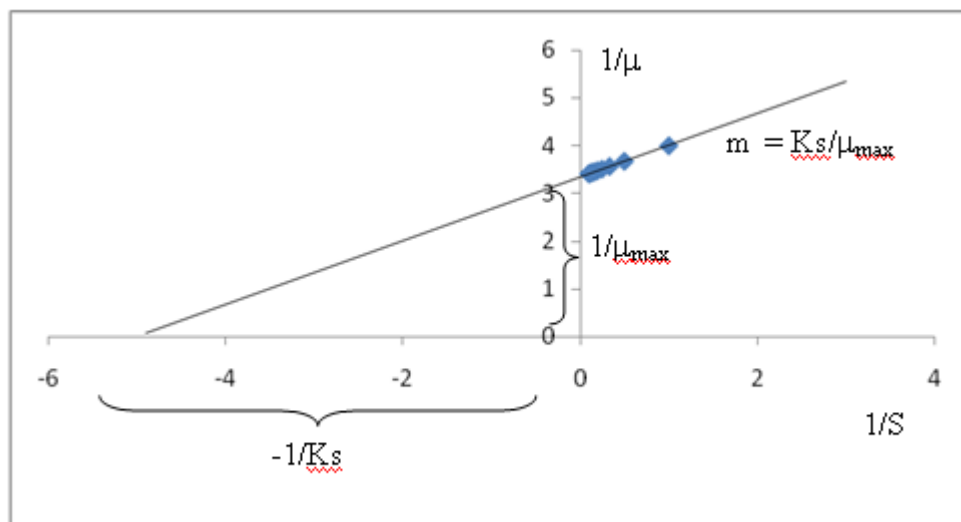


Figura 1.4. Determinación de los parámetros cinéticos.

Dependencia con la Temperatura.

La velocidad específica de crecimiento (μ), por ser una constante cinética, es función de la temperatura, siguiendo un modelo del tipo de Arrhenius, como el que se muestra a continuación:

Ec (6)

$$K = A \exp[-E_a/RT]$$

Donde:

A = Constante de Arrhenius

E_a = Energía de Activación

R = Cte. Universal de los gases

T = Temperatura en °K

También la velocidad específica de crecimiento es función del pH; sin embargo, en lo que refiere al presente texto nos limitaremos a mencionar que existen organismos que prefieren desarrollarse en pH's ácidos o acidófilos como los hongos, levaduras y algunas bacterias; así como también en pH's alcalinos o basidófilos como bacterias (Aiba, 1973).



1.1.2 CINÉTICA DEL SUSTRATO

En lo que refiere a la cinética del sustrato se debe considerar el siguiente balance de masa, considerando los términos donde se consume sustrato. Así el balance o cinética de sustrato se plantea de la siguiente forma (Aiba, 1973):

$$\left\{ \begin{array}{c} \text{Consumo} \\ \text{de} \\ \text{Sustrato} \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{c} \text{Crecimiento} \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{c} \text{Mantenimiento} \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{c} \text{Producto} \end{array} \right\}$$

Lo que se traduce en:

Ec (7)

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + mX + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt}$$

En esta ecuación aparecen dos variables estequiométricas importantes; $Y_{X/S}$ y $Y_{P/S}$, los cuales se denominan rendimientos biomasa-sustrato y producto-sustrato, son la relación que existe en cada gramo de biomasa o producto producidos por gramo de sustrato consumido.

La forma para determinarlos es la siguiente (Aiba, 1973):

Ec (8)

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\max} - X_o}{S_o - S} \quad Y_{P/S} = \frac{P - P_o}{S_o - S}$$

Donde:

$X_{\max}$ = biomasa máxima producida

(g/L)

X_o = biomasa inicial

(g/L)

S = Sustrato residual

(g/L)



1.1.3 CINÉTICA DEL PRODUCTO

Al igual que en las reacciones químicas, existen una gran diversidad de modelos cinéticos, pero de manera general en el caso del producto la ecuación más representativa es la de Luedeking – Piret (Aiba, 1973):

Ec (9)

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

La cinética del producto puede seguir tres tipos de producción:

- **Producción asociada al crecimiento.** Se presenta cuando los organismos producen en la etapa de crecimiento. El modelo cinético antes descrito considera únicamente el primer término.
- **Producción no asociada al crecimiento.** Se presenta cuando los organismos dejan de crecer, produciendo metabolitos denominados secundarios. En el modelo cinético sólo se considera el segundo término.
- **Producción parcialmente asociada al crecimiento.** En este tipo de producción los organismos se producen durante toda la fermentación, desde que inicia su crecimiento y posterior a éste. Se utiliza el modelo completo.

1.2 REACTORES IDEALES (ECUACIONES DE DISEÑO)

Para comenzar con el estudio de los reactores biológicos es necesario considerar algunos puntos importantes. Como lo son en principio los fundamentos que aplican a los reactores químicos como el balance de masa y la cinética principalmente.



Así también se asume que son reactores isotérmicos, por lo que la temperatura debe de ser controlada de manera muy precisa para el cultivo de microorganismos o para evitar desnaturalizaciones de biomoléculas o componentes celulares y por tanto el balance de energía no se ha considerado. En modelos cinéticos más complejos se consideran los balances bioquímicamente estructurados en los cuales se toman rutas metabólicas complejas y por tanto los balances de materia y energía asociado a las múltiples reacciones bioquímicas que acompañan una fermentación o a la biocatálisis.

Para desarrollar las ecuaciones de diseño de los fermentadores o reactores biológicos para cultivo celular, debe tomarse en cuenta el balance de masa que se plantea para cualquier equipo donde exista una transformación de la materia:

$$\left\{ \begin{array}{c} \text{Entrada del} \\ \text{componente } i \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{c} \text{Generación o} \\ \text{consumo del} \\ \text{componente } i \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{c} \text{Salida del} \\ \text{componente } i \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{del} \\ \text{componente } i \end{array} \right\}$$

1.3 CULTIVOS Y FERMENTACIONES

Lo primero que hay que entender en el diseño de reactores biológicos a diferencia de los químicos es que, su cinética no esta determinada exclusivamente por la velocidad de reacción y las variables que la determinan. Aunque se puede describir de manera similar a la química, la cinética biológica también depende de características intrínsecas del organismo o cultivo tales como crecimiento y tasa de división celular, así como, del tipo de operación que se lleve a cabo. Por eso, lo primero que se define en el diseño de un biorreactor es el propósito de utilización; es decir, que tipo de cultivo se va a utilizar, el modo de operar y el proceso de cultivo. El conjunto biorreactor-sistema de cultivo debe cumplir con los siguientes objetivos:

- ≈ Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- ≈ Mantener constante y homogénea la temperatura.



- ≈ Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.
- ≈ Prevenir la sedimentación y la floculación.
- ≈ Permitir la difusión de gases nutrientes a la velocidad requerida por el cultivo.
- ≈ Mantener el cultivo puro.
- ≈ Mantener un ambiente aséptico.
- ≈ Maximizar el rendimiento y la producción.
- ≈ Minimizar el gasto y los costos de producción.
- ≈ Reducir al máximo el tiempo el conjunto biorreactor-sistema de cultivo.

1.4 DISEÑO DE BIORREACTOR TIPO LOTE ALIMENTADO (FEED BATCH)

El empleo de biorreactores por lote alimentado permite la obtención de bioproductos mediante el empleo de microorganismos. En este tipo de cultivos el medio se añade continuamente al biorreactor eliminándose simultáneamente un volumen proporcional del medio fermentado, con esto se logra que la etapa de formación de producto sea lo más larga posible (Cabrera y col., 2001).

De manera común este tipo de cultivo pasa por cuatro etapas diferentes, según se muestra en la **Tabla 1.1**.

Tabla 1.1. Características de las fases de un cultivo.

Fase del cultivo	Característica
Latencia	Adaptación del microorganismo a las condiciones del medio.
Exponencial o logarítmica	La velocidad del crecimiento aumenta gradualmente, las células crecen a una velocidad constante máxima.
Desaceleración	Los nutrientes se van agotando y los productos van siendo excretados por el microorganismo, la velocidad de crecimiento disminuye.
Estacionaria	El crecimiento cesa debido al frecuente agotamiento de un nutriente esencial o a la acumulación de algún producto tóxico.

Un sistema de cultivo discontinuo no posee alimentación (F1) o lavado (F2); se carga el contenido del biorreactor (tanda o lote) con el medio de cultivo y luego se inocula con el cultivo (células o microorganismos) y se deja crecer hasta obtener el producto (biomasa o metabolito).

La realización de la curva de crecimiento (Figura 1.3) en conjunto a la curva de muerte es representada por su logaritmo $\ln(k)$ versus el inverso del tiempo $1/T$ que conduce a la determinación gráfica de la temperatura óptima.

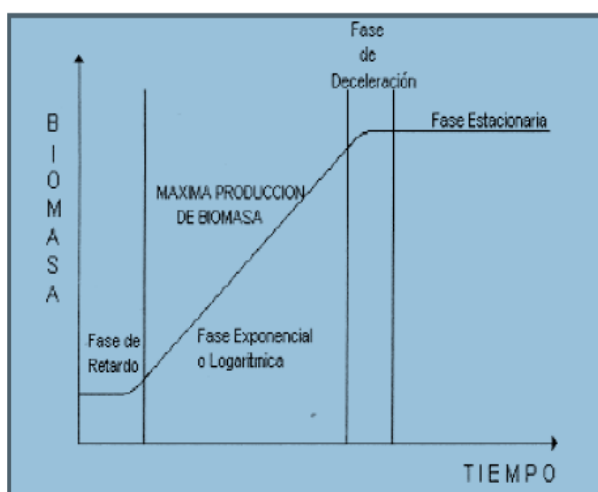


Figura 1.5. Fases de cultivo en un biorreactor tipo lote alimentado (Cabrera y col., 2001).

1.5 FENOMENO DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO EN LA CÉLULA A PARTIR DE BURBUJAS DE AIRE.

El aire se inyecta por la parte inferior del tanque y es distribuido por una corona que posee pequeños orificios espaciados regularmente. El chorro de aire que sale de cada orificio es “golpeado” por las paletas de la turbina inferior generándose de este modo miles de pequeñas burbujas de aire, desde las cuales difunde el oxígeno hacia el seno del líquido. El sistema de agitación se completa con cuatro o seis deflectores que tienen por finalidad cortar



o romper el movimiento circular que imprimen las turbinas al líquido, generándose de este modo mayor turbulencia y mejor mezclado.

El tanque está rodeado por una camisa por la que circula agua, lo que permite controlar la temperatura. Para tanques mayores de 1000 o 2000 litros este sistema ya no es eficiente y es reemplazado por un serpentín que circula adyacente a la pared interior del tanque. Debe tenerse en cuenta que a medida que es mayor el volumen de cultivo también es la cantidad de calor generado, por lo que se hace necesario una mayor área de refrigeración. Los tanques que son de acero inoxidable y están pulidos a fin de facilitar la limpieza y posterior esterilización. El aire que ingresa al biorreactor debe estar estéril, lo que se consigue haciéndolo pasar por un filtro cuyo diámetro de poro es de 0.45 micrones, que impide el paso de microorganismos y esporas. También se pueden utilizar membranas (Millipore) de 0.2 micrones de poro.

La velocidad de transferencia de oxígeno, RO_2 , desde el seno de la fase gaseosa (burbujas) hasta la fase líquida está dada por la ecuación (Bailey y Ollis, 1986):

E_c (10)

$$RO_2 = K_L a (C^* - C)$$

Donde $K_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, C la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido y C^* la concentración de oxígeno disuelto que estaría en equilibrio con la presión parcial de oxígeno de la fase gaseosa. El $K_L a$ depende del diseño del biorreactor, de las condiciones de operación (caudal de aire, agitación) y de la viscosidad del cultivo. A mayor viscosidad menor $K_L a$ (Bailey y Ollis, 1986).

El $K_L a$ es una medida de la capacidad que posee un biorreactor para suministrar oxígeno y el rango de valores usuales está comprendido entre 50 h^{-1} y 1000 h^{-1} .



Es útil calcular el K_La necesario para que la velocidad de transferencia de oxígeno sea igual a la de consumo; esto significa que RO_2 y los valores de K_La iguales o superiores al calculado aseguran que el cultivo no está limitado de oxígeno (Bailey y Ollis, 1986).

1.6 REACTOR DE FLUJO PISTÓN

Pertenece a los reactores ideales el reactor de flujo en pistón, de flujo tubular ideal, y de flujo uniforme.

Se caracteriza por que el flujo del fluido a través es ordenado, sin que ningún elemento del mismo sobre pase o se mezcle con cualquier otro elemento situado antes o después de aquel, en realidad, en este reactor puede hacerse mezcla lateral de fluido, pero nunca ha de existir mezcla o difusión a lo largo de la trayectoria de flujo. La condición necesaria y suficiente para que exista flujo en pistón es que el tiempo de residencia en el reactor sea el mismo para todos los elementos del fluido (esto sólo se puede establecer a partir del segundo principio de la termodinámica) (Levenspiel, 1987).

El reactor de flujo de pistón o tapón se refiere exclusivamente a un modelo y no a un tipo de reactor. Este modelo puede emplearse tanto como base así como para describir el comportamiento de reactores tubulares en que se realiza una reacción homogénea como, mediante pocas suspensiones adicionales, para modelar reactores catalíticos de lecho empaquetado.

El reactor tubular no necesariamente debe ser recto ni constar de un solo segmento. En ambas configuraciones se emplea otro fluido para controlar la temperatura del reactor.

También se puede optar por calentamiento directo empleando uno o varios quemadores.

Otra opción es controlar la temperatura alimentando el fluido de intercambio al interior de los tubos y empacar el lado de la coraza. Existe una gran variedad de diseños y posibles modos



de operación, la configuración más adecuada dependerá de la fase en que se realiza la reacción, la velocidad másica, la velocidad de reacción, el calor de reacción, la cantidad de inertes, etc. Por supuesto que todos los reactores pueden emplearse en forma adiabática y, de hecho, este modo de operación es muy frecuente en aplicaciones industriales. Si la reacción consume o genera demasiada energía, la configuración puede existir en varios reactores conectados en serie con un intercambiador entre cada reactor.

Si hacemos un corte transversal y el reactor está colocado horizontalmente, la gravedad puede ocasionar que el volumen superior simplemente no se llene con el líquido o catalizador.

El modelo de flujo tapón supone que no existe mezclado ni difusión en la dirección del flujo e ignora los efectos de entrada y salida del reactor. No existirán perfiles radiales por que todas las moléculas que se encuentran en toda la circunferencia de una posición axial dada, llevan exactamente el mismo tiempo dentro del reactor y han pasado por las mismas condiciones de operación.

El modelo implica que no existe un perfil radial de la velocidad lineal, esto es, la velocidad es idéntica en todo el elemento de volumen que forma el disco o pistón. Esto implica que, para el modelo flujo pistón sea aplicable, la operación debe caer dentro del régimen de flujo turbulento por lo que se desprecia el efecto de la condición de no deslizamiento en la pared del tubo.

La operación es no-isotérmica y/o no-isobárica.

Ahora vamos a deducir la ecuación de diseño comenzando con un balance microscópico de masa para el reactivo limitante (Tiscareño, 2008):

$$\left\{ \begin{array}{c} \text{Entradas de} \\ \text{Reactivo limitante} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{c} \text{Salidas de} \\ \text{Reactivo limitante} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{c} \text{Consumo por Rx} \\ \text{de } r/l \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{c} \text{Acumulación del} \\ \text{reactivo limitante} \end{array} \right\}$$



El balance anterior se realizó para el reactivo limitante pero, de acuerdo al desarrollo de la sección anterior, recordamos que dicho balance molar y las ecuaciones que se desarrollen a continuación son aplicables a otros productos y reactivos. El balance macroscópico puede escribirse como (Tiscareño, 2008):

Ec (11)

$$(F_{rl})_{Entrada} - (F_{rl})_{Salida} - \int_0^{V_R} (-\tau_{rl}) dV_R = 0$$

El balance de masa expresado por la ecuación anterior es aparentemente idéntico al desarrollado para un reactor de tanque agitado y representado por la misma ecuación. Para el modelo de flujo pistón, la velocidad de reacción cambia conforme la mezcla reaccionante fluye a través del reactor y debemos tomarlo en cuenta en pasos posteriores de la deducción de la ecuación de diseño. Matemáticamente no es trivial resolver la ecuación anterior por lo que debemos poner la ecuación para $(-\tau_{rl})$ en función de V_R antes de integrar. Es mejor separar variable de manera diferente para lo cual derivamos el balance macroscópico (Tiscareño, 2008):

Ec (12)

$$-dF_{rl} - (-\tau_{rl})dV_R = 0$$

Sustituimos el flujo del reactivo limitante en función de la fracción conversión y despejamos de la siguiente manera puesto que $(-\tau_{rl})$ sí es trivial dejarla solo en función de f_{rl} (Tiscareño, 2008):

Ec (13)

$$dV_R = \frac{-dF_{rl}}{(-\tau_{rl})} = \frac{F_{rl0} df_{rl}}{(-\tau_{rl})} = \frac{\nu_0 C_{rl0} df_{rl}}{(-\tau_{rl})}$$



Debemos notar que al reemplazar $\nu_0 C_{rl0}$ por F_{rl0} no se está haciendo ninguna suposición adicional. Integramos y sustituimos la definición de tiempo espacial para obtener (Tiscareño, 2008):

Ec (14)

$$\tau = C_{rl0} \int \frac{df_{rl}}{(-\tau_{rl})}$$

Esta ecuación de diseño se prefiere cuando se tiene una sola reacción independiente para un reactor en que se suponga flujo pistón. Es aplicable tanto a líquidos como a gases y salió de un balance molar del reactivo limitante. La ecuación también es aplicable a reactores no isotérmicos.

1.6.1 REACTOR TUBULAR

El modelo de flujo pistón supone que coexiste mezclado en la dirección axial y que tanto la entrada como la salida no ocasionan los llamados efectos de los extremos.

Dependiendo del diseño propio del reactor, en la entrada del reactor se debe distribuir la alimentación a todo el diámetro del reactor tubular. El distribuidor puede ser tan simple como la expansión, con o sin curvatura, hasta distribuidores de tubos múltiples con inyectores o toberas. Del lado de la salida el problema es similar, pero a la inversa. En la zona de entrada existirán cambios en la dirección del flujo y esto ocasionará turbulencia e incluso remolinos. Las esquinas son propensas a generar puntos muertos o cuando menos cierto estancamiento en relación al resto del cuerpo del reactor. Aún para flujos bajos considerados como laminares se presentan los efectos de los extremos. Los efectos extremos conforman generalmente la causa dominante, las desviaciones al flujo tapón (Tiscareño, 2008).

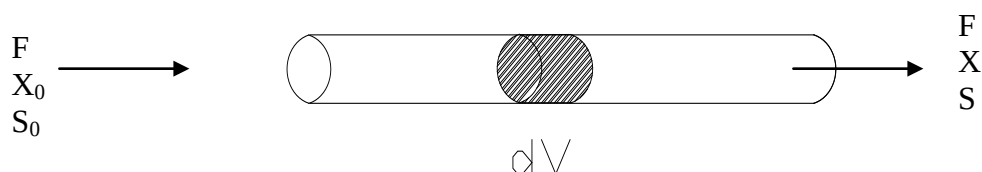
1.6.2 REACTOR DE FLUJO PISTÓN

Lo mencionado anteriormente es para el caso de reactores químicos, trasladando esta información para reactores biológicos el modelado del reactor de flujo pistón es muy similar al de un reactor por lotes.

Reactor PFF (Plug Flow Fermentor) Fermentador de flujo pistón

El Fermentador de flujo pistón es un reactor tubular donde el fluido se maneja de tal forma que el flujo tenga un perfil de pistón, para que no existan gradientes en la dirección radial del tubo, para esto se utilizan tapas especiales.

Para establecer la ecuación de diseño aplicamos el balance para la biomasa en una sección diferencial de volumen del reactor, debido a que las concentraciones cambian según la posición en este:



Ec (15)

$$FX|_V + r_x dV = FX|_{V+dV} + \frac{dX}{dt} dV \quad (\text{Régimen estacionario})$$

Agrupando:

$$FX|_V - FX|_{V+dV} = -r_x dV$$

Aplicando el límite a dV



$$\begin{aligned}\lim_{dV \rightarrow 0} \frac{FX|_{V+dV} - FX|_V}{dV} &= r_X \\ \frac{d(FX)}{dV} &= r_X \\ F \frac{dX}{dV} &= r_X \\ \frac{F}{dV} &= \frac{1}{dt} \\ \frac{dX}{dt} &= r_X \\ r_X &= \mu X \\ \frac{dX}{dt} &= \mu X\end{aligned}$$

La cual es la misma ecuación que el reactor en batch, ya que este reactor opera de forma dinámica en cuanto a la posición.

En este tipo de reactores continuos, se pueden presentar gradientes de concentración en función de la posición (longitud “L”), por lo cual es un reactor que igual que el batch opera en forma dinámica y de acuerdo a lo presentado por Levenspiel, la ecuación de diseño es la misma, sólo que en lugar de tiempo de fermentación se utiliza el tiempo de residencia:

Ec (16)

$$\begin{aligned}\int_0^{t_r} dt &= \int_{X_0}^X \frac{dX}{\mu X} \\ t_r &= \int_{X_0}^X \frac{dX}{\mu X}\end{aligned}$$

Y el cálculo del volumen se realiza de la siguiente forma:

Ec (17)

$$V = F \cdot t_r$$



CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 LA SANGRE: REGULADOR HOMEOSTÁTICO

La sangre es el tejido encargado de los procesos de transporte y homeóstasis en los animales vertebrados. La sangre está compuesta por dos fracciones de composición y organización muy compleja. La primera es una fracción líquida que se encarga del transporte de nutrimentos y de células, regular la temperatura y el pH corporal.

Esto ocurre, gracias a las propiedades fisicoquímicas de la sangre que se resumen en la **Tabla 2.1**. La segunda fracción está compuesta de elementos celulares, en donde se han identificado a la fecha hasta nueve tipos de células diferenciadas que circulan en la sangre o que se encuentran en tejidos específicos. Una forma de clasificar a las células, consiste en agruparlas en dos familias en función de su origen; la linfóide y la mieloide.

La **Tabla 2.2** incluye una clasificación de las células y sus funciones. Cada una de estas especies celulares tiene funciones muy específicas y vitales para el organismo.

Por ejemplo, los eritrocitos son células especializadas en el transporte de oxígeno desde los pulmones hacia todos los tejidos del cuerpo. Los leucocitos conforman una vasta línea de defensa contra agentes extraños al organismo, conocida como respuesta inmune y los trombocitos o plaquetas participan en el mecanismo de coagulación ante la presencia de traumatismos en el individuo.

Tabla 2.1. *Propiedades fisicoquímicas de la sangre*

Propiedad	Valor
Viscosidad	4,5 a 5,5 mPa.s
Temperatura	37-38 ° C
Ph	7.35 a 7,45
Salinidad	0.85 a 9 %
Proporcion del peso corporal	8%
Volumen (hombres)	5 a 6 L
Volumen (mujeres)	4 a 5 L
Fracción líquida	50 a 60 %



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

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

2.2 LA HEMATOPOYESIS

2.2.1 CONCEPTO DE CÉLULA MADRE HEMATOPOYÉTICA

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

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

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

En las últimas décadas se han realizado una serie de estudios que demuestran que todos los elementos celulares presentes en la sangre circulante provienen de un progenitor común: la célula madre hematopoyética (CMH) o *stem cell*. Esta célula se caracteriza por la capacidad



que tiene de autoreplicarse y de diferenciarse para dar origen a todas las células sanguíneas. El proceso hematopoyético no es del todo conocido, sin embargo, se sabe que la CMH da origen a diferentes progenitores hematopoyéticos incapaces de autoreplicarse, pero con una alta capacidad prolífica. Los progenitores hematopoyéticos durante la proliferación adquieren características que los comprometen a cierta línea celular, generando precursores que al madurar dan origen a las células de la sangre (**Figura 2.1**).

2.2.2 PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Los progenitores hematopoyéticos son células provenientes de la CMH que son capaces de generar colonias en medios semisólidos. En la actualidad el ensayo clonogénico es el método estandar para cuantificar los progenitores hematopoyéticos *in vitro*. El ensayo se lleva acabo en un medio con metilcelulosa, rico en nutrimentos y en factores de crecimiento. Estos cultivos tienen como finalidad la de promover el desarrollo de colonias que son clasificadas en base a sus propiedades morfológicas.

Los progenitores hematopoyéticos que se pueden observar son las unidades formadoras de colonias de granulocitos (UFC-G), unidades formadoras de colonias de macrófagos (UFC-M), unidades formadoras de colonias de eritrocitos (UFC-E). A estos progenitores se les conoce como progenitores tardíos. Los progenitores tempranos son las unidades formadoras *burst* muy primitivas de eritrocitos (UFB-E). unidades formadoras de granulocitos y de macrófagos (UFC-GM). Las unidades formadoras de granulocitos-eritrocitos-macrófagos y megacariocitos (UFC-GEMM) o colonias mixtas (UFC-Mix) son los progenitores hematopoyéticos más simples que pueden observarse en cultivo. Las unidades formadoras de colonias con alto poder proliferativo (UFC-HPP), son progenitores menos diferenciados de células GM (Collins y col. 1997; Mayani y col, 1993; Mayani y col. 1998).

Los progenitores de megacariocitos (UFC-Mk) son identificados utilizando un medio con matriz de colágeno, y factores como Tpo, IL-3 y IL-6. Posteriormente se realiza un ensayo



de inmunocitoquímica utilizando como marcador a CD41 presente en los megacariocitos y que permite distinguir a los megacariocitos de los macrófagos (Bertolini y col. 1997).

2.2.3 ERITROPOYESIS

La eritropoyesis es el proceso por el cual se generan los eritrocitos. La primera célula eritroide que se puede reconocer morfológicamente es el pronormoblasto que es una célula grande con cromatina ligeramente aglutinada y nucleolos. Esta célula da origen a normoblastos más pequeños que contienen mayor cantidad de hemoglobina. Finalmente, el núcleo es excluido del normoblasto dando origen a reticulocitos, los cuales contienen cierta cantidad de RNA y son capaces de producir hemoglobina. Los reticulocitos permanecen de 1 a 2 días más en la médula ósea o circulando en sangre periférica antes de madurar, principalmente en el bazo, cuando el RNA desaparece por completo y dan origen a eritrocitos maduros (**Figura 2.1**).

Generalmente de un pronormoblasto se obtienen 16 glóbulos rojos. Debido a la gran cantidad de eritrocitos que se generan cada día, la médula ósea requiere de muchas sustancias y hormonas para sintetizar la hemoglobina, tales como hierro, manganeso, cobalto, vitaminas, tiroxina y eritropoyetina. Esta última es la proteína responsable de la estimulación y regulación de la eritropoyesis. El estímulo para la producción de la eritropoyetina es la tensión de oxígeno disuelto en los tejidos del riñón (Hoffbrand y Pettit, 1991), mientras que el TGF- β es un potente inhibidor de la eritropoyesis (Dybedal y Jacobsen, 1995).

En los estudios *in vitro* que se han realizado, se ha demostrado que las bajas tensiones de oxígeno disuelto favorecen el desarrollo de las colonias eritroides E-CFU y E-BFU (Rich y Kubanek, 1982).

2.2.4 CÉLULAS LTC-IC

Como se mencionó, la CMH tiene las características de autoreplicarse y la capacidad de sostener la hematopoyesis a largo plazo. No obstante, hasta la fecha no ha sido posible



aislar a la CMH. Hasta el momento, la forma que se tiene de demostrar *in vitro* dichas características, es mediante la realización de los cultivos denominados a largo plazo, diseñados por Dexter y col. (1977). Estos cultivos se realizan utilizando una capa de células adherentes que nutren de algunos factores a las células hematopoyéticas. La capacidad de sostenimiento de la hematopoyesis se mide por la generación de progenitores después de al menos 5 semanas de cultivo. A las células con esta capacidad se les denomina células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC, *long-term culture-initiating cells*). Este método es al momento la forma estándar de mostrar la capacidad de sostenimiento de la hematopoyesis de un cultivo *in vitro*. Recientemente, se ha tratado de definir marcadores de superficie para identificar a la CMH.

2.2.5 MARCADORES DE SELECCIÓN

Los marcadores de superficie utilizados para el reconocimiento de la CMH, pueden ser combinaciones muy variadas, dependiendo del juicio de los autores. Principalmente se menciona a CD34⁺, una proteína que participa en los mecanismos de adhesión, como principal marcador de la CMH. No obstante, la población de células CD34⁺, es muy heterogénea e incluye a fibroblastos, células endoteliales y progenitores hematopoyéticos. Se ha mencionado al antígeno Thy-1 como un marcador de poblaciones muy primitivas (Mayani y Lansdorp. 1994). En la actualidad se han reportado trabajos con fracciones celulares tales como CD34⁺ CD38⁻ (Zannettino y col. 1998); CD34⁺ CD59⁺ (Hill y col., 1996); CD34⁺ HLA⁻DR⁻NhL⁻ (Verfaillie, 1993); CD34⁺ CD45RA^{bajo} CD71^{bajo} (Mayani y col., 1993), CD34⁺ Lectin⁺ (Pipia y Long, 1997), entre otras. Yin y col. (1997) reportaron que las células que muestran la proteína AC133, tienen un gran poder proliferativo, por lo cual puede ser considerada también como uno de los marcadores de la CMH. Zannettino y col. (1998) reportaron una población conteniendo el antígeno CD164, una glicoproteína que participa en el proceso de adhesión de los progenitores hematopoyéticos sobre las células estromales. Dichos autores demostraron que al bloquear a CD164, la expansión de las células CD34⁺ CD38⁻, es menor. Esto sugiere que CD164 representa un potente receptor para suprimir la proliferación de las células hematopoyéticas.

En base a la información disponible se puede suponer que la CMH puede tener un fenotipo tan complejo como: $CD34^+$, $Thy1^+$, $Rhoda^{bajo}$, $HLA-DR^-$, $C-kit^+$, Lin^- , $CD38^-$, $CD59^+$, $AC133^+$, $C164^+$. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que una fracción de células humanas $CD34^- Lin^-$, presenta un alto poder de proliferación y se ha demostrado que es capaz reconstituir el sistema hematopoyético en modelos de ratón (Bhatia y col., 1998).

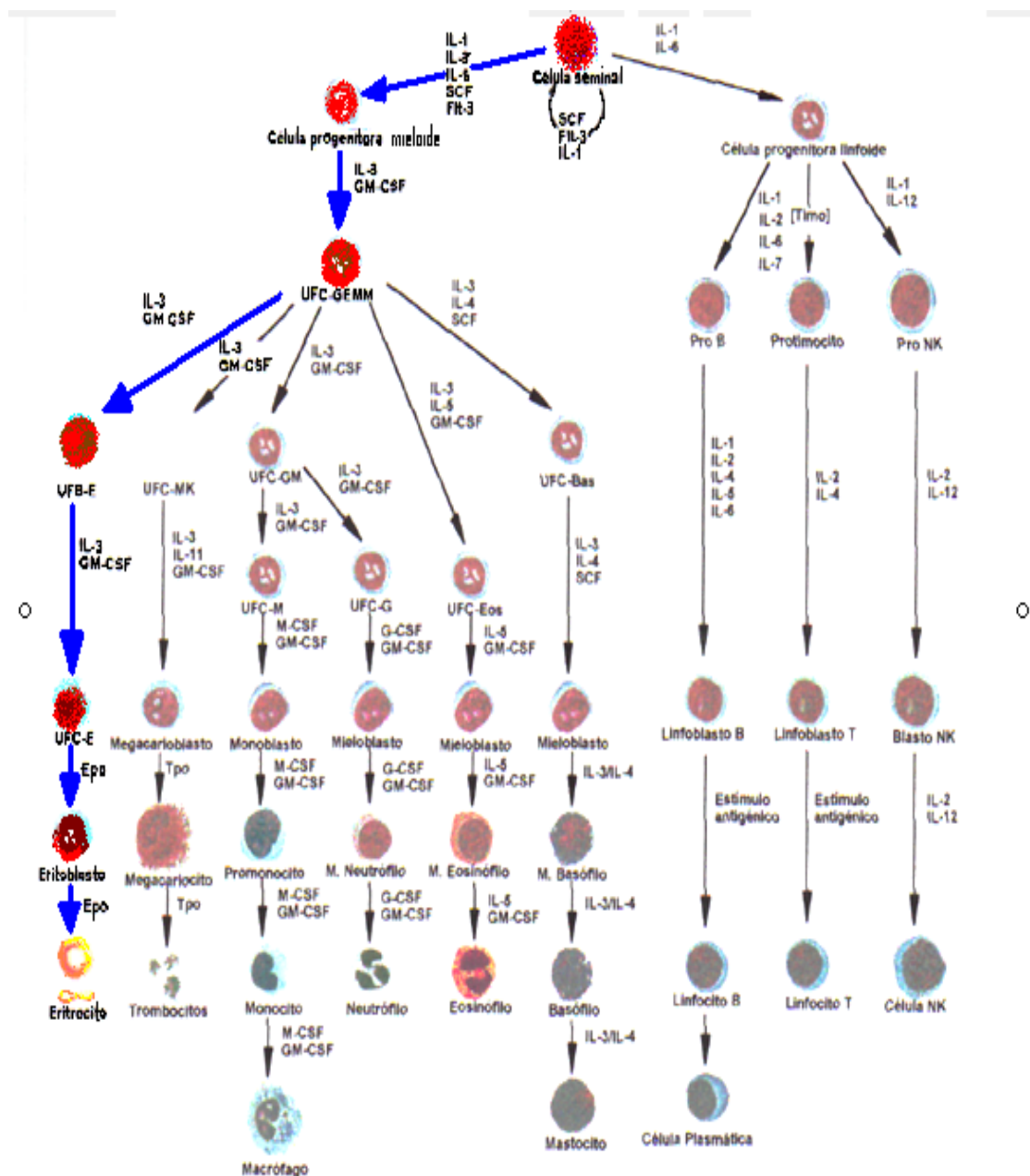


Figura 2.1. Esquema general de la hematopoyesis.



2.3 MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO

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

Tabla 2.4 Componentes propios y asociados de la matriz extracelular.

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

2.3.1 FACTORES ESTIMULADORES DE LA HEMATOPOYESIS

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



Tabla 2.5 Características funcionales de diferentes factores hematopoyéticos (Cowling y Dexter, 1994). * no es un factor de crecimiento, +: inductor. -: supresor, ?: se desconoce (De León, 1999).

Factor de crecimiento	Proliferación	Sobrevivencia	Actividad apoptótica
IL-1	+	+	-
IL-2	+	?	-
IL-3	+	+	-
IL-5	+	+	-
IL-6	+	+	-
GM-CSF	+	+	-
G- CSF	+	+	-
M-CSF	+	?	-
Epo	+	+	-
SCF	+	+	-
MIP-1 α	-	?	-
IFN- γ	-	+	-
Antígeno FAS *	?	?	+
TGF- β	-	-	+

2.3.2 INTERLEUCINAS

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

Interleucina 3 (IL-3): Es una citocina con actividad sobre los progenitores hematopoyéticos más primitivos, por lo que se le conoce como factor multipotente. IL-3 es producida por los linfocitos T_H 1 y T_H 2, se ha reportado que promueve importantemente el crecimiento y desarrollo de los mastocitos, una función que es incrementada por IL-4.

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



2.3.3 FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS Y OTROS FACTORES

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

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

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

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

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

2.4 APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

Hasta la fecha, los tejidos hematopoyéticos son sensibles a tratamientos como la quimioterapia y radioterapia, que comúnmente se utilizan en el tratamiento de algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama y de ovario. Por otra parte, existen numerosas enfermedades relacionadas con alteraciones en el sistema hematopoyético, como la anemia de Fanconi, la anemia falciforme, diversas leucemias y las talasemias, entre otras. La forma de contender con estos problemas clínicos consiste en transplantes de células



hematopoyéticas de donadores compatibles posterior a tratamientos rnieloablativos (Gluckman y col., 1989; Wagner y col., 1992; Kohli-Kumar y col., 1993).

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

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

2.5 FUENTES DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

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



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

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

2.5.1 CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Durante la última etapa del período prenatal, un buen número de células hematopoyéticas está presente en la sangre circulante fetal, incluyendo la sangre del cordón umbilical. En los años se presentaron las primeras evidencias de que la sangre de cordón umbilical es una fuente muy importante de células hematopoyéticas (Knudtzon, 1974). Recientemente, se han incrementado los estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando las células hematopoyéticas de la sangre de cordón umbilical (Koller y col., 1992; Mayani y Lansdorp, 1994; Piacibello y col., 1997). La conclusión obtenida fue que los progenitores presentes en tal fuente tienen un mayor potencial de proliferación que el observado en las muestras de médula ósea (Broxmeyer y col., 1989a; Broxmeyer y col. 1992; Mayani y col. 1993; Lansdorp y col., 1993). La **Tabla 2.6** enumera las características de la sangre de cordón umbilical y de otras fuentes.

La sangre de cordón umbilical tiene muchas características favorables respecto a las otras fuentes de células hematopoyéticas, Entre las cuales se puede mencionar, el potencial

proliferativo de las células embrionarias, los linfocitos no han sido del todo estimulados (la enfermedad de injerto contra hospedero es menos agresiva), las muestras son fácilmente recolectables y sin efecto adverso para el donador (Thompson 1995). Sin embargo, debido a la naturaleza de las muestras, la cantidad de células provenientes de la sangre de cordón umbilical está un orden de magnitud por debajo de los requerimientos para tratar a pacientes adultos (2×10^9 células). Esta limitación puede resolverse mediante la expansión *in vitro* de las células antes de ser transplantadas. En 1989, se reportó por primera vez el transplante de la sangre de cordón umbilical a un infante con anemia de Fanconi, enfermedad potencialmente letal que se caracteriza por la incapacidad de producir células sanguíneas maduras (Gluckman y col., 1989).

Los resultados del transplante fueron muy alentadores y en la actualidad, se han realizado alrededor de 600 trasplantes de sangre de cordón umbilical en Estados Unidos y en Europa, la gran mayoría en infantes. Estos trabajos aunados a una serie de estudios *in vitro*, han llevado a conclusión de que la sangre de cordón umbilical es una fuente muy importante de células con utilidad clínica.

Tabla 2.6 Características de las fuentes disponibles de células hematopoyéticas humanas (De León, 1999).

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

Nota: - Ausencia de actividad, +/- resultado dudoso, + presencia de actividad, ++ máxima actividad observada



2.6 EXPANSIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

2.6.1 EXPANSIÓN *IN VITRO* EN CULTIVOS ESTÁTICOS

El primer intento exitoso de un sistema de cultivo que logró en forma reproducible mantener la hematopoyesis fue descrito por Dexter y col. (1977). Actualmente, distintos grupos de investigación han estudiado diferentes condiciones operacionales para realizar cultivos *in vitro* de células hematopoyéticas de médula ósea (Broxmeyer y col., 1990; Du y col., 1995), sangre periférica (Haylock y col., 1992; Brugger y col., 1993; Henschler y col., 1994) y de sangre cordón umbilical (Koller y col., 1992; Mayani y Lansdorp, 1994; Piacibello y col., 1997).

Los cultivos estáticos, han sido utilizados para evaluar el efecto de diferentes combinaciones de citocinas (Haylock y col., 1992), para realizar estudios en cocultivos (Koller y col., 1995a) y para evaluar el efecto del volumen y frecuencia de recambio de medio de cultivo (Koller y col., 1995a). No obstante, estos sistemas son inherentemente de bajo volumen y presentan serias desventajas.

Por ejemplo, no se pueden escalar directamente debido a que estos sistemas no son homogéneos, son difíciles de monitorear y están sujetos a manipulación intensiva que complica la operación y aumenta el riesgo de contaminación. Así mismo, dado que la transferencia de oxígeno se lleva a cabo exclusivamente por métodos difusionales, las áreas superficiales los cultivos pueden estar limitados por oxígeno (Peng y Palsson, 1996). Todo lo anterior dificulta el traslado de tales cultivos a mayores escalas, necesarias para satisfacer las demandas clínicas. Por tal motivo, en los últimos años se ha dedicado gran atención hacia el desarrollo de nuevos métodos para la expansión de células hematopoyéticas en volúmenes que se consideren químicamente útiles.



2.6.2 CULTIVOS EN BIORREACTOR

El biorreactor, es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial. Es el recipiente donde se realiza el cultivo, y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para el tipo celular a cultivar, es por eso que a continuación se muestran las características de algunos reactores que se han llevado a la experimentación (Tabla 2.7 y Tabla 2.8).

Tabla 2.7 Evaluación de las características de biorreactores (Guevara, 2004)

Característica	RAM	Columna de burbujeo	Airlift
	Entre 3 y 5. No más de 2 para cultivos de células animales	Entre 4 y 5	Entre 4 y 7
Relación altura/diámetro			
	Mecánica	Neumática	Neumática
Agitación			
Factores que influyen en el funcionamiento	Velocidades de aireación y agitación, tipo de agitador	Velocidad de flujo de gas y propiedades del fluido	Velocidades de inyección del gas y de circulación del líquido. Relación AO/Ar
	Mayor capacidad de mezclado, transferencia de calor y masa.	Bajos costos de capital y operación, diseño simple y varios requerimientos de energía.	Altamente eficientes en energía.
Ventajas			
	Altos requerimientos energéticos, generación de calor.	$k_L a$ relativamente bajos.	$k_L a$ relativamente bajos, aunque superiores a la columna de burbujeo.
Desventajas			
	Cultivo de células animales, producción de antibióticos.	En la industria química, cultivo de células vegetales, producción de vinagre y cerveza y tratamiento de aguas residuales.	Cultivo de células bacterianas y bacterianas, fermentaciones con hongos, cultivo de células vegetales y animales, tratamiento de aguas residuales.
Usos			



Tabla 2.8 Ventajas y desventajas dependiendo el tipo de biorreactor (De León, 1999)

Biorreactores	Ventajas	Desventajas
Sistema de perfusión.	Desarrollado por Koller y col. (1993a y 1993b). Este diseño es muy versátil, ya que se pueden realizar cultivos con o sin estroma, es posible remover constantemente los desechos tóxicos como el amonio, lactato y factores inhibitorios.	Difíciles de muestrear, presentan costos muy elevados debido a la pérdida continua de medio de cultivo que es subutilizado y en general, presentan gradientes de sustratos y de variables como pH. Oxígeno y CO ₂ disueltos. Todo esto da como resultado que el microambiente celular sea poco definido.
Proceso con células inmovilizadas mediante un reactor agitado.	Es posible monitorear en forma separada la cinética de proliferación y diferenciación de cada población. Aquí los progenitores hematopoyéticos provenientes de médula ósea fueron micro encapsulados en forma independiente, utilizando polímeros de alginato que permite proteger a las células de posibles daños mecánicos por la agitación. Levee y col. (1994).	Existe heterogeneidad en la densidad poblacional entre micro cápsulas, ocurren problemas de difusión y se presentan gradientes de sustratos en las mismas. Se pueden dañar las células al liberarlas de la micro cápsula.
Micro acarreadores en biorreactores agitados.	Presenta la ventaja de permitir cultivos de mayor volumen que los cultivos estáticos, por lo que no hay diferencias significativas con estos cultivos. Sardonini y Wu (1993) y posteriormente Zandstra y col. (1994).	Se pueden contaminar. Difícil de monitorear. No son homogéneos.
Reactor Airlift	Highfill y col. (1996) cultivaron células de médula ósea murinas utilizando un reactor airlift donde las células se colocaron en un lecho empacado y el medio de cultivo fue continuamente recirculado. La ventaja es que se mantuvo la hematopoyesis hasta por 11 semanas.	Se requiere de un proceso adicional para recuperar las células que están adheridas a la fibra de vidrio, proceso que puede dañar a las células.
Cultivos en Suspensión mediante sistemas agitados	(Verfaillie, 1992). Desarrolló la investigación de cultivos en suspensión. Los sistemas agitados con células libres presentan una serie de características que los hacen muy ventajosos sobre los sistemas inmovilizados. son sistemas homogéneos, son fáciles de instrumentar, de controlar automáticamente y de escalar, además de que la toma de muestra es sencilla y representativa del cultivo. Dentro de los cultivos en suspensión se puede mencionar los trabajos de Sardoni y Wu(1993) quienes fueron pioneros en utilizar este tipo de cultivos.	Presentan productividades bajas. Esto se debe, entre otras causas, a la fragilidad propia de las células de mamífero (Ramírez y Mutharasan, 1992), a la limitación de algunos sustratos y/o factores hematopoyéticos y a la toxicidad de los desechos metabólicos en los cultivos celulares como lactato y amonio (Ramírez y Mutharasan, 1990: Sandström y col., 1994).



CAPITULO 3

JUSTIFICACIÓN

Según reporta la Organización Mundial de la Salud (OMS), pruebas procedentes del mundo entero demuestran que la incidencia de sangre contaminada con algún agente infeccioso transmisible por transfusión (VIH, virus de la hepatitis, *Tripanosoma cruzi*, etc.) es mucho mayor entre donantes familiares de reposición que entre donantes voluntarios no remunerados. Debido al impacto que estos padecimientos generan en la población sobre todo como cofactores para la adquisición del VIH, se hace necesario que los países miembros de la OMS conozcan e implemente acciones tendientes a prevenirlas y tratarlas (CENSIDA/ ONUSIDA, 2007).

De acuerdo a los registros del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS) en el año 2007, el envío e intercambio de componentes de la sangre tan solo en el Distrito Federal, correspondió a 54977 concentrados eritrocitarios (CE), contra una recolección de 53411 bolsas de sangre total (ST) recolectadas, sin embargo en el caso de los Institutos de Cardiología "Ignacio Chávez", de Pediatría, y de los Hospitales: de la Mujer y el Central Sur de Alta Especialidad, así como el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y de la Clínica de Especialidades de la mujer de la Secretaria de la Defensa Nacional (SEDENA), el suministro de los CE a sus diferentes servicios, superó el número de unidades recolectadas, por lo que de forma global este dato refleja un déficit de 1576 bolsas de CE, que en este caso debió ser cubierta por el sistema de suministro interinstitucional.

Por otra parte, en estadísticas del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea de Morelos (CETS) el porcentaje de rechazados es de alrededor del 50 %, es decir de cada 10 disponentes que acuden a donar sólo 5 son captados, el resto son rechazados por diversas causas.

Como consecuencia de lo anterior la reserva de componentes sanguíneos es insuficiente comparada con la demanda que existe en nuestro Estado. De las unidades que se requieren



trimestralmente sólo el 54% es suministrada, el resto tiene que obtenerse en otras instituciones, comprometiendo la salud o incluso la vida del paciente.

La OPS, recomienda que para cubrir las necesidades de componentes sanguíneos, el 2% de la población deberá convertirse en donador. En el caso de Morelos, el INEGI, proyectó para el año 2007 una población total de 1 millón 612 mil 899 habitantes (INEGI, 2005), es decir, se requirieron 32 mil 258 donaciones al año, sin embargo, solo se recolectaron 25 mil, lo que demostró un déficit de 7, 258 componentes sanguíneos.

Por lo cual la problemática se centra en la inexistencia de donantes voluntarios, la alta probabilidad de que un candidato a donador sea rechazado (mas del 50%), los periodos de ventana prolongados (desde meses hasta años), la posibilidad de errores sistemáticos, aleatorios o clericales, lo cual conlleva a que el acto transfusional sea un riesgo inherente al tratamiento para los pacientes.

En este contexto, la sangre de cordón umbilical utilizada en terapias de reemplazo medular en el tratamiento de patologías neoplásicas o no neoplásicas, es en primera instancia, una alternativa para el aislamiento, cultivo y selección clonar de células madre hematopoyéticas. Por otra parte, existe la posibilidad de controlar *in vitro* la diferenciación hacia precursores celulares (eritroides) y eritrocitos funcionales.

Con este trabajo se propone un biorreactor de tipo lote alimentado en un sistema tubular de tanque agitado con condiciones optimizadas y controladas para la obtención de eritroides en suspensión, susceptibles de ser empleados en pacientes humanos como terapia de sustitución en padecimientos como anemia crónica, insuficiencia renal o sometidos a quimioterapia. El reactor propuesto, permitirá desplazar el uso de los componentes sanguíneos procedentes de donadores humanos, por aquellos obtenidos por procedimientos industriales.



CAPITULO 4

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Diseñar una propuesta de un biorreactor de tipo lote alimentado en un sistema tubular de tanque agitado para el crecimiento de eritroides libres de patógenos en suspensión , para implementarlo en un futuro como una terapia de sustitución en pacientes de servicios de medicina transfusional .

OBJETIVOS PARTICULARES

- Proporcionar las condiciones de operaciones adecuadas para que las células en suspensión “eritroides” se puedan cultivar satisfactoriamente.
- Asegurar homogeneidad entre los componentes ahí mismo y por lo tanto obtener el producto deseado sin afectar a las células de interés.
- Proporcionar una transferencia de oxígeno óptima para la conservación de las células y lograr el producto de interés.
- Su diseño permitirá su limpieza y esterilidad sin contratiempo.
- Tendrá un sistema de control de pH, T y Espuma.
- El diseño de este biorreactor será de 5 litros donde se pueda monitorear con una computadora y se controlen las variables.
- Proponer el diseño del biorreactor tipo lote alimentado de acuerdo a las características de los que existen en el mercado donde el costo sea bajo y el rendimiento sea excelente.
- Evaluar el daño de las Células por Stress Mecánico.
- El consumo de energía debe ser el mínimo posible.



CAPITULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

De acuerdo a la metodología propuesta por Santa Olalla (2009) se obtuvo la muestra previo consentimiento informado a partir de de cordón umbilical en pacientes del servicio de gineco obstetricia del Hospital General de Cuernavaca “Dr. José G. Parres sangre” (Figura 2.2).

Se obtuvo el tiempo de duplicación y la velocidad específica de crecimiento. Con estos datos se propone el diseño de un biorreactor tipo lote alimentado en un sistema tubular. Para esto consta de nueve etapas, empleando una mezcla de inductores solos o en conjunto con los factores de crecimiento se promoverá un rendimiento mayor en la generación de precursores eritrocitarios en cultivos a partir de SCUH (Figura 2.2).

Tabla 2.9. Reportes de Generación de Precursores Neurales con medios adicionados con Sueros (Santa Olalla, 2009).

Población seleccionada	Medio de Propagación	Fenotipos encontrados
Línea de Celulas Madre tipo Neural derivadas de la SCUH.	Medio DMEM adicionado con 10%FBS , Antibioticos y antimicótico(AAS), los primeros dos meses, posterior a esto, medio DMEM/F12, 2%FBS suplementado con AAS, B27,LIF y EGF	Nestina , GFAP, β -III Tubulina, MAP-2, NF-200, S-100 β .
FM-SCUH CD34+.	Medio DMEM/F12 suplementado con 30%FBS las primeras 24hrs. Después medio DMEM/F12 conteniendo 10%FCS, 5%FCS, 5%FCS + EGF	Ki67, Sox2, OTX1, Nestina , GFAP y NF200
Células CD133+ de la FM-SCUH criopreservada	Medio DMEM conteniendo 10%FBS y 0.1% Gentamicina	Vimentina, Nestina , A2B5, GFAP, S100, GalC, TuJ1, MAP2 y NF.
CD133+/- de SCUH	Medio de Metilcelulosa conetiendo 30%FBS , 1%BSA, 0.1mM β -Mercaptoetanol, 2mM L-Glutamato de Sodio, SCF, GM-CSF e IL-3.	Nestina , Musashi1, NF-L, NF-M, NF-H, SYN, GFAP y BMP
FM-SCUH	DMEM adicionado con 10%FBS , EGF y bFGF	Musashi1, Nestina , β III-Tubulina, NeuN y GFAP.

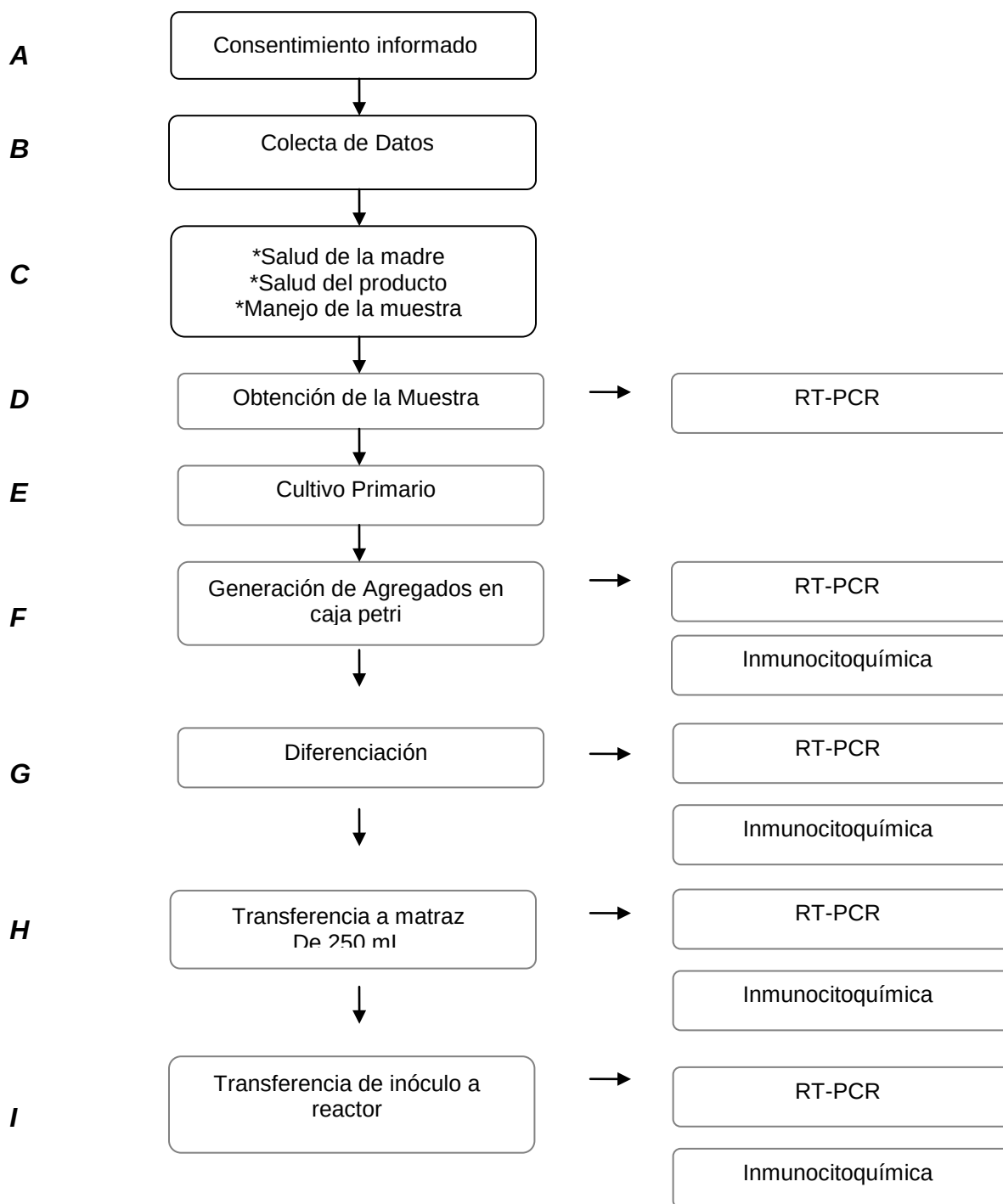


Figura 2.2. Algoritmo para la obtención y procesamiento de la muestra.



A Carta de consentimiento informado. Este es un documento fundamental para el ingreso de la muestra a la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular “Dr. Ruy Pérez Tamayo”/Hospital del Niño Morelense (UDMM). Este documento garantiza la aceptación del donante de sangre de cordón umbilical en este protocolo. La redacción y los términos de este documento fue supervisado por la Academia Nacional Mexicana de Bioética, capítulo Morelos.

B Colecta de datos: Los datos de identificación de la muestra, fueron colectados en la forma de registro y consistió en nombre, edad, dirección, número de gestas y antecedentes gineco obstétricos, así como patologías relacionadas. Así mismo los datos de identificación personal fueron codificados y a las muestras se les asignó un código numérico a fin de proteger la confidencialidad del participante.

C Criterios de calidad de la muestra: En cualquier caso, antes de obtener la muestra, se aseguró que el estado de salud, tanto de la madre como del producto, no estuviera comprometido. Solo se integraron al estudio, las muestras procedentes de donantes sin antecedentes de patologías asociadas a la presencia de enfermedades susceptibles de transmisión sanguínea como las representadas por los virus de la hepatitis B y C, ó de la inmunodeficiencia humana (VIH). Tampoco aquellas con evidentes signos de hemólisis o lipemia.

D Obtención de la muestra: La muestra se obtuvo a partir del cordón umbilical una vez concluido el trabajo de parto. Estuvo a cargo del médico ginecólogo y fue colocada en tubo falcon de 50 mL con anticoagulante EDTA. Se colocó en sistema cerrado de conservación y se traslado al laboratorio de la UDMM donde se procedió a su procesamiento.

E Cultivo primario: Se transfirió a medio de cultivo primario a base de Medio DMEM adicionado con 10% FBS, antibióticos y antimicótico (AAS), los primeros dos meses, posterior a esto, medio DMEM/F12, 2% FBS suplementado con AAS, B27, LIF y EGF (Tabla 2.9). Se utilizaron caja tipo elisa de base ancha



F Generación de agregados: Se estuvo monitoreando en condiciones de esterilidad el desarrollo de cultivo diariamente por un lapso de 15 días, haciéndose conteos en cámara Newbauer. En esta etapa se emplearon los oligonucleótidos UDMM 1 y 2 (datos susceptibles de patente), respectivamente para confirmar la multiplicación de los precursores hematopoyéticos.

G Diferenciación y H transferencia del cultivo: Los cultivos en los cuales se tuvieron resultados positivos en la RT PCR, fueron seleccionados para su transferencia en condiciones de esterilidad al medio de cultivo en matraz de 250 mL. El medio empleado fue el utilizado en el cultivo primario. Adicionalmente se estuvo monitoreando en condiciones de esterilidad el desarrollo de cultivo diariamente por un lapso de 15 días, haciéndose también conteos en cámara Newbauer. Una vez cuantificada la carga celular correspondiente al 10% de inóculo del volumen de trabajo, se propone la transferencia al birreactor diseñado en este trabajo.

Este paso es el último donde se le añade los factores de crecimiento, los inductores para favorecer la diferenciación del producto hacia la formación de eritroides funcionales. Similar a los casos anteriores, se monitorea el desarrollo del cultivo obteniendo la densidad celular y la diferenciación a base de RT PCR. En esta etapa se recomienda también el empleo de técnicas de inmunocitoquímica para confirmar la obtención de la línea celular deseada.



CAPITULO 6

PROPUESTA DEL BIORREACTOR.

La presente tiene la finalidad de obtener un diseño del fermentador de acuerdo a los que existen en el mercado haciéndose algunas modificaciones para evaluar el daño que las células sufren por stress mecánico y así también mejorarlo para obtener un excelente rendimiento.

De acuerdo a la información recolectada de los fermentadores descritos en el capítulo de antecedentes, propongo un Biorreactor de tipo lote alimentado en un sistema tubular, en silicón inmerso de tanque agitado con un volumen nominal y de trabajo de 5 y 3.5 L respectivamente, suplementado con un inóculo del 10% (250 mL) de precursores celulares para el crecimiento de eritroides en suspensión libres de patógenos donde se obtendrán las siguientes ventajas: agitación, flujo y mínimo daño por stress mecánico.

Las dimensiones del reactor consisten en un cilindro de 29.4 cms de altura por 14.7 cms de diámetro interno con una espiral interna de Silicon Masterflex® de Cole Parmer Instrument Co. Vernon Hills Illinois, permeable a los nutrientes, con una luz entre la pared interna de las mamparas y la manguera de silicon de 0.5 cms, como unidad primaria de producción (UPP), el reactor considera la integración de 50 UPP, lo que representa un volumen de 3.0 L. La operación de este reactor con tiempo de residencia de 21 días permitirá obtener un rendimiento estimado del 80% sobre el volumen inicial lo que representa la obtención in vitro de 6 bolsas de concentrados de eritrocitos. Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

De acuerdo a Levenspiel (1987) se tomo en un volumen total de 5.0 L de un reactor el volumen del líquido debe ser 0.7 veces el volumen total del reactor. Dando un volumen de líquido de 3.5 L Posteriormente procedimos a calcular el diámetro del reactor dando una medida de 14.7 cm. Luego se procedió a calcular la altura del líquido que fue de 20.6cm. y por ultimo antes de calcular el diámetro y longitud de la manguera se calculo la altura total del reactor que es el doble del diámetro de un reactor (Levenspiel, 1987) obteniendo una



altura total de 29.4cm. Luego se procedió hacer los cálculos de la manguera considerando que la formula del cilindro en la cual nos dio un perímetro de 46.18 con una longitud de 2300 cm (23 m) equivalente a 50 vueltas y un diametro de 1.28 cm ($\frac{3}{4}$ "), considerando que el volumen del reactor tubular es de 3.0 L. La manguera tiene las siguientes especificaciones soporta una presión máxima de 80 psi, se puede esterilizar por los siguientes métodos en Auto clave, Oxido de Etileno o Gamma Irradiación, máxima temperatura de 400° F (205°C) El biorreactor consta de 4 Baffles o Mamparas con una distancia de cada uno de 3.6cm entre ellos, constara de 3 bombas. Una para la transferencia de oxigeno, segundo para el movimiento peristáltico dentro de la manguera de los eritrocitos y la tercera para eliminar los desechos que se formen.

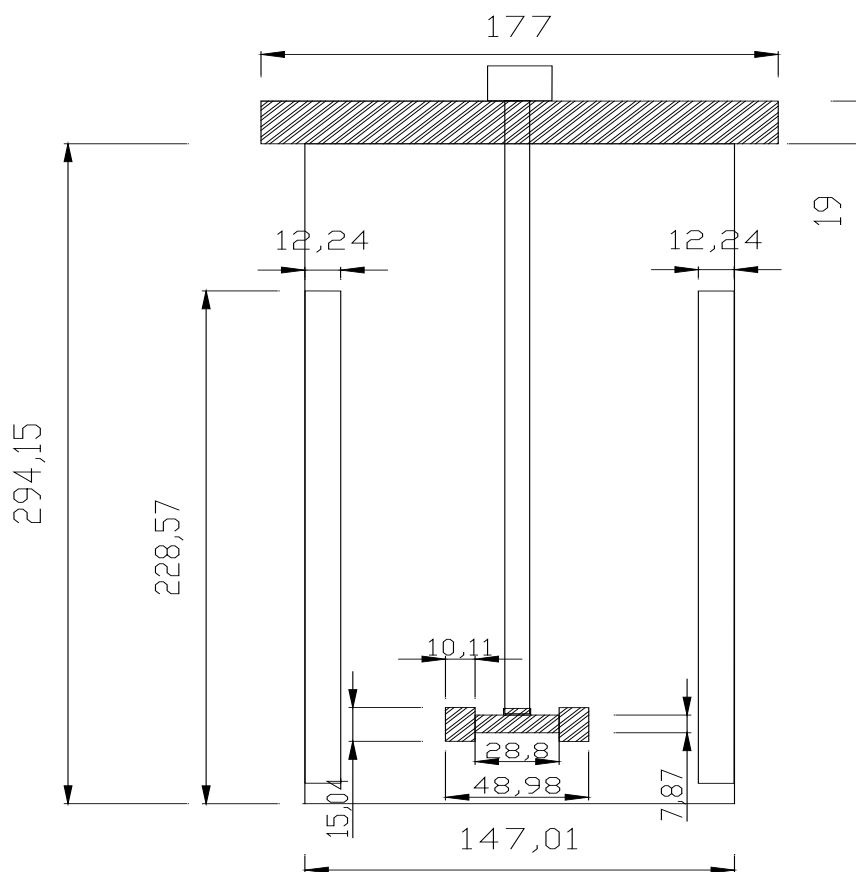


Figura 2.3 Sección transversal de la propuesta de reactor tipo tanque agitado. Se destacan las dimensiones de los baffles y la turbina tipo Rushton con una propela. Programa empleado AutoCad 2008 (cotas están expresadas en milímetros).

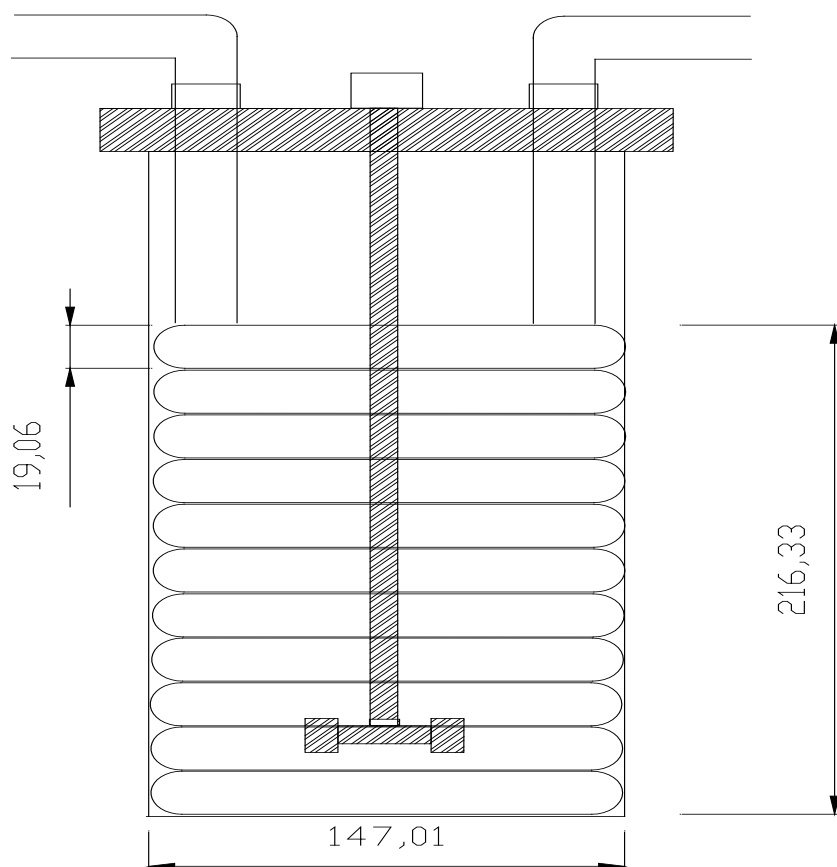


Figura 2.4 Sección transversal del reactor interior con una espiral interna de Silicon Masterflex® de Cole Parmer Instrument Co. Vernon Hills Illinois. Este diseño es inédito en el cultivo de células de mamífero. Programa empleado AutoCad 2008 (cotas están expresadas en milímetros).



Ec (18)

$$VT = 5L$$

$$VL = 0.7VT = 0.7(5L) = 3.5L$$

Ec (19)

$$VT = \frac{\pi T^3}{2}$$

$$T = \frac{\sqrt[3]{2(5 \times 10^{-3})}}{\pi} = 0.147m = 14.7cm$$

Ec (20)

$$VL = \frac{\pi T^2}{4} HL = 3.5 \times 10^{-3}$$

$$HL = \frac{4(3.5 \times 10^{-3})}{\pi(0.147)^2} = 0.206m = 20.6cm$$

Ec (21)

$$\frac{HT}{T} = 2$$

$$HT = 2(14.7) = 29.4cm$$

Calculo del rendimiento:

Ec (22)

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} = \frac{(14 \times 10^6 - 1 \times 10^6) \text{ Cel / ml}}{(4.3 - 0.5) \text{ g / L}} = \frac{1.3 \times 10^6 \text{ cel / L}}{3.8 \text{ g / L}} = 3.4 \times 10^6 \text{ Cel / g}$$

Ec (23)

$$VRT = 3.0L$$

$$0.003M^3 = \frac{\pi D^2}{4} L$$

Ec (24)

$$P = \pi D = 0.46M$$

$$\text{Con } 10 \text{ vueltas} = 4.6m$$

$$D = \frac{\sqrt[2]{4(0.003)}}{\pi(4.6)} = 0.0288m$$

$$D = 2.88cm$$

$$\text{Con } 20 \text{ vueltas} = 9.2m$$

$$D = \frac{\sqrt[2]{4(0.003)}}{\pi(9.2)} = 0.024m = 2.04cm$$

$$\text{Con } 50 \text{ vueltas} = 23m$$



$$D = \frac{\sqrt[3]{4(0.003)}}{\Pi(23)} = 0.01288m = 1.28cm$$

$$D = \frac{3}{4}" = 1.28cm$$

Calculo del volumen de un eritrocito:

Ec (25)

$$V_e = \frac{4}{3}\Pi r_e^3 = \frac{4}{3}\Pi(4 \times 10^{-6})^3 = 2.68 \times 10^{-16} m^3 = 2.68 \times 10^{-13} L / erit$$

$$D_e = 8 \times 10^{-6} m$$

$$r_e = 4 \times 10^{-6} m$$

$$\frac{3L}{2.68 \times 10^{-13} L / erit} = 1.11 \times 10^{13} eritocitos$$

$$14 \times 10^6 cel / ml (3000ml) = 42 \times 10^9 cel$$

$$42 \times 10^9 cel (2.68 \times 10^{-13} L / cel) = 0.011L = 11.0ml$$

Balance de masa

Ec (26)

$$FX|_V + \mu X \Delta V = FX|_{V+\Delta V}$$

$$F(X|_V - X|_{V+\Delta V}) = -\mu X \Delta V$$

$$\frac{F(X|_V - X|_{V+\Delta V})}{\Delta V} = -\mu X$$

$$\frac{F(X|_{V+\Delta V} - X|_V)}{\Delta V} = +\mu X$$

$$\lim_{\Delta V \rightarrow 0} \frac{(X|_{V+\Delta V} - X|_V)}{\Delta V} = +\frac{\mu X}{F}$$

$$r_x = \mu X$$



$$\frac{dX}{dV} = + \frac{\mu X}{F}$$

$$F \frac{dX}{dV} = + \mu X$$

Ec (27)

$$t = \frac{V}{Q} \quad dt = \frac{dV}{Q}$$

Ec (28)

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

Ec (29)

$$\int_0^{tr} dt = \int_{X_0}^X \frac{dX}{\mu X}$$

$$tr = \int_{X_0}^X \frac{dX}{\mu X}$$

Ec (30)

$$\frac{dX}{dV} = \frac{\mu X}{F}$$

$$V = \int_{X_0}^X \frac{F dX}{\mu X} = F \int_{X_0}^X \frac{dX}{\mu X}$$

$$F = \frac{L}{h}$$

$$X = \frac{g}{L}$$

$$\frac{UFC}{g}$$

Balance de sustrato

Ec (31)

$$FS|_V + \frac{\Delta V \mu X}{Y_{X/S}} = FS|_{V+\Delta V}$$

$$F(S|_V - S|_{V+\Delta V}) = - \frac{\Delta V \mu X}{Y_{X/S}}$$



$$\frac{F(S|_V - S|_{V+\Delta V})}{\Delta V} = -\frac{\mu X}{Y_{X/S}}$$

$$\lim_{\Delta V \rightarrow 0} \frac{S|_V - S|_{V+\Delta V}}{\Delta V} = -\frac{\mu X}{FY_{X/S}}$$

$$\frac{dS}{dV} = -\frac{\mu X}{FY_{X/S}}$$

Ec (32)

$$S = -\int \frac{tr}{V} \frac{\mu X}{Y_{X/S}} dV$$

$$S = -\frac{tr}{Y_{X/S}} \int \mu X \frac{dV}{V}$$

$$S = -\frac{tr \mu X}{Y_{X/S}} \int_0^V \frac{dV}{V}$$

$$S = -\frac{tr \mu X}{Y_{X/S}} \ln V \Big|_0^V$$

Feed Batch .

Para iniciar un feed batch supondremos que se inicia la alimentación del cultivo cuando el sustrato limitante se ha agotado. Si bien este no es un requisito indispensable, permite simplificar el tratamiento matemático y además es un buen punto de partida con respecto al objetivo del feed batch, es decir: controlar la velocidad de crecimiento mediante la velocidad



de alimentación. También supondremos que alimentamos con medio de cultivo fresco, es decir que $X_1=0$ y $P_1=0$. Luego los balances de materia para X,S y P serán :

$$\frac{d(XV)}{dt} = Vr_x = V\mu X \quad \text{Ec (33)}$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_1 - Vr_s \quad \text{Ec (34)}$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = Vr_p \quad \text{Ec (35)}$$

A fin de no extender innecesariamente el tratamiento matemático discutiremos la formación de biomasa y el consumo de sustrato. De todos modos, si r_p es conocida el procedimiento no varía mayormente.

Si en la ecuación (34) se reemplaza r_s por $r_x/Y_{x/s}$ y se tiene en cuenta la ecuación (33) resulta

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_1 - \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{d(XV)}{dt} \quad \text{Ec (36)}$$

Si deseamos que la velocidad de crecimiento esté controlada por la alimentación, esta deberá ser tal que en todo momento sea $S=0$ y por lo tanto $d(SV)/dt=0$. Esto equivale a decir que el sustrato es consumido totalmente ni bien ingresa al biorreactor. Luego:

$$\frac{d(XV)}{dt} = Y_{x/s} FS_1 \quad \text{Ec (37)}$$

e integrando

$$XV = X_0 V_0 + Y_{x/s} FS_1 t \quad \text{Ec (38)}$$

Donde X_0 y V_0 representan la concentración de biomasa y el volumen de cultivo en el momento de iniciar la alimentación. La variación de V con el tiempo se obtiene integrando:



$$V = V_0 + Ft \quad \text{Ec (39)}$$

El criterio para diseñar una alimentación adecuada se obtiene combinando las ecuaciones (33) y (37), de donde $at=0$, resulta:

$$FS_1 = \frac{V_0 \mu X_0}{Y_{X/S}} \quad \text{Ec (40)}$$

En la ec. (40) se puede emplear cualquier valor de u hasta u_m , por tanto la ec.(40) puede reescribirse como:

$$FS_1 \leq \frac{V_0 \mu_m X_0}{Y_{X/S}} \quad \text{Ec (41)}$$

Como criterio adicional conviene seleccionar el valor de S_1 tan alto como sea posible y F relativamente pequeño a fin de evitar la excesiva dilución del cultivo. La contrapartida es que la duración del feed batch puede prolongarse excesivamente, por lo que normalmente se trata de encontrar la solución de compromiso, donde intervienen además, aspectos económicos.

El valor de u durante el batch varia permanentemente, ya que por la ecuación (33) es :

$$\mu = \frac{1}{XV} \frac{d(XV)}{dt} \quad \text{Ec (42)}$$

Reemplazando en la ecuación (42) las ecuaciones (37) y (38) resulta

$$\mu = \frac{Y_{X/S} FS_1}{X_0 V_0 + Y_{X/S} FS_1 t} \quad \text{Ec (43)}$$

Por lo tanto u disminuye con el tiempo. Esto es valido solamente para el caso tratado aquí, es decir con F y con S_1 constantes, pero nada impide hacer alimentaciones con $F=F(t)$ o $S_1=S_1(t)$, con la cual puede lograrse, por ejemplo, que u se mantenga constante o bien que



aumente hasta valores cercanos a u_m . La diversidad de alimentaciones posibles que pueden emplearse es, quizás, una de las características mas apreciables de feed batch. La otra es que este sistema de cultivo es muy apropiado para obtener altas concentraciones de biomasa, muy superiores a las que se podrían obtener en un batch, donde la limitación esta dada por la concentración inicial de nutrientes del medio de cultivo que pueden tolerar los microorganismos.

Si se considera el mantenimiento celular el valor de r_s para la fuente de carbono y energía vendrá dado por:

$$\frac{d(XV)}{dt} + Y'_{X/S} m_s XV = FS_1 Y'_{X/S} \quad \text{Ec (44)}$$

Resolviendo la ecuación diferencial se obtiene:

$$XV = \frac{FS_1}{m_s} + (X_0 V_0 - \frac{FS_1}{m_s}) e^{-m_s Y'_{X/S} t} \quad \text{Ec (45)}$$

También se muestra fácilmente que en este caso el criterio para calcular la alimentación esta dada por:

$$FS_1 \leq \frac{V_0 \mu_m X_0}{Y'_{X/S}} + m_s X_0 V_0 \quad \text{Ec (46)}$$

En la Figura 2.6 se representa la ecuación (45) para distintos valores de m_s , y la ecuación (38) que corresponde al caso de $m_s=0$ se observa claramente que cuanto mayor es m_s menor es la cantidad de biomasa obtenida, además de las curvas con m_s distinto de 0 tienden asintóticamente a un valor máximo que está dado por:

$$(XV)_{\max} = \frac{FS_1}{m_s} \quad \text{Ec (47)}$$

Este valor se obtiene directamente de la ecuación (44) haciendo $d(XV)/dt=0$. En estas condiciones la totalidad de la fuente de carbono y energía que ingresa al biorreactor se utiliza para mantenimiento celular y por lo tanto ya no es posible aumentar la cantidad de



biomasa. Alternativamente, si el cultivo se realiza con el objeto de obtener un producto perteneciente al grupo I (asociado a I metabolismo energético), convendrá trabajar siempre en las condiciones indicadas, ya que toda la fuente de carbono suministrada se transformará en el producto deseado.

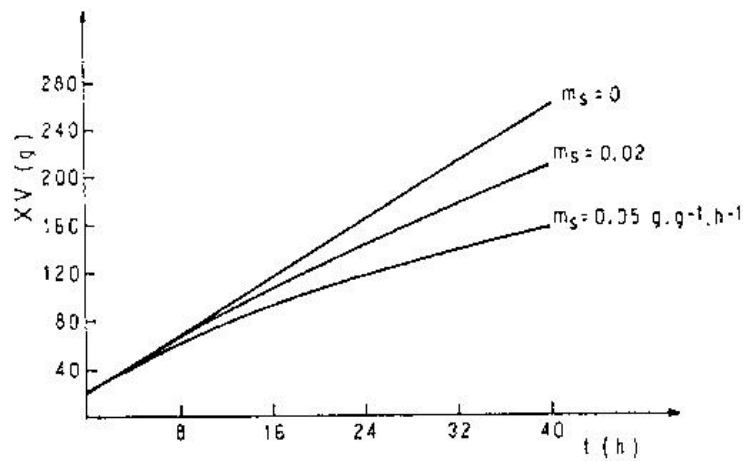


Figura 2.6. *Feed batch con alimentación constante. Parámetros: $F = 0.05 \text{ h}^{-1}$; $S_1 = 240 \text{ g.l}^{-1}$; $Y'_{X/S} = 0.5 \text{ Cel/g}$; $X_0 = 10 \text{ g.l}^{-1}$; $V_0 = 2 \text{ l}$. El volumen final es 4 l.*



CAPITULO 7

RECOMENDACIONES

- 1) Evaluar el funcionamiento del biorreactor en condiciones experimentales *in vitro*, con diferentes concentraciones de inóculo
- 2) Estandarizar las variables físicas y químicas del reactor
- 3) Cuantificar el consumo de sustrato y su relación con la ganancia de biomasa
- 4) Evaluar la viabilidad de los eritroides obtenidos en este sistema de producción
- 5) Efectuar un análisis de factibilidad para el escalamiento del reactor a un volumen industrial
- 6) Diseñar el proceso para el destino final de los eritroides en sistemas de conservación que permitan su empleo con fines terapéuticos en seres humanos.
- 7) Se requiere la selección del donante de precursores hematopoyéticos con la menor carga antigénica posible.



CAPITULO 8

CONCLUSIONES

- a) La sangre de cordón umbilical utilizada en terapias de reemplazo medular en el tratamiento de patologías neoplásicas o no neoplásicas, es una alternativa para el aislamiento, cultivo y selección clonar de células madre hematopoyéticas.
- b) Por otra parte, existe la posibilidad de controlar *in vitro* la diferenciación hacia precursores celulares (eritroides) y eritrocitos funcionales. Con este trabajo se propone un biorreactor de tipo lote alimentado en un sistema tubular de tanque agitado con condiciones optimizadas y controladas para la obtención de eritroides en suspensión, susceptibles de ser empleados en pacientes humanos como terapia de sustitución en padecimientos como anemia crónica, insuficiencia renal o sometidos a quimioterapia.
- c) El reactor propuesto, permitirá desplazar el uso de los componentes sanguíneos procedentes de donadores humanos, por aquellos obtenidos por procedimientos industriales. Cabe mencionar que el presente trabajo es solo una propuesta y revisión de las estrategias para producir y tener disponibilidad a escala comercial, este tipo de células son importantes para el ser humano . Así como también que este proyecto pudiera trasladarse a otro tipo de células como leucocitos y plaquetas.



CAPITULO 9

REFERENCIAS

Aiba. Biochemical Engineering. Editorial Academic Press, inc., 1973. 93-126, 130-160, 163-193,

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

Bailey, J. E. y Ollis, D. F., 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Mc Graw-Hill Book Company: 70, 71, 230-256.

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

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

Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hagoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L., y Boyse, E. A., 1989a. *Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem /progenitor cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3828-3832.

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

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

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

Cabrera, A., Aranda, J., García, A., Jiménez, S., Chairez, I., Zaragoza, I., Aguilar, B., Mendoza, K., Montoya, S., Campos, C., Rodríguez, C., Valencia, I., Trujano, G., Gálvez, G., Gómez, Y. y Bautista, M., 2001. *Lógica difusa aplicada al reconocimiento de las etapas de cultivo de Saccharomyces cereviceae*: 1.



Cartier, N., López, J., Moullier, P., Rocchiccioli, F., Rolland, M. O., Jorge, P., Mosser, J., Mandel, J. L., Bougnères, P. F., Danos, O., Aubourg, P., 1995. *Retro viral mediated gene transfer corrects very long chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy*. Proc. Natl. acad. Sci. USA 92 (5): 1674-1687.

(CENSIDA; ONUSIDA México, 2007) www.censida.salud.gob.mx/interior/letras/2007/2007.html -

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

Cowling, G. J., y Dexter, T. M., 1994. *Apoptosis in the hematopoietic system*. J. Leukoc. Boil. 59: 61-66.

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

De León, R. MA. 1999. *Cultivo de células hematopoyéticas humanas suspendidas en reactores instrumentados: Utilidad de la velocidad del consumo de oxígeno y el potencial redox*. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Tesis de Doctorado.

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

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

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

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

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

Guevara, L. E. 2004. *Diseño, construcción y caracterización hidrodinámica de un biorreactor multifuncional*. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Tesis de licenciatura



- Gluckman, E., Broxmeyer, H.E., Aurebach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Theiry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J., y Boys, E.A., 1989. *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means umbilical cord blood from an HLA identical sibling*. N. Engl. J. Med. 321 (17): 1174-1178.
- Haylock, D. N., Dowse, T. L., Juttner, C. A., and Simmons, P. J., 1992. *Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34⁺ cells into the myeloid lineage*. Blood 80 (6): 1405-1412.
- Henscheler, R., Brugger, W., Luft, T., Mertelsmann, R. F., y Kans, L., 1994. *Maintenance of transplantation potential in ex vivo expanded CD34⁺ selected human peripheral blood progenitor cell*. Blood 84(9): 2898-2903.
- Highfill, J. G., Haley, S. D., y Kompala, D. S., 1996. Large-scale production of murine bone marrow cells in airlift packed bed reactor. Biotechnol. Bioeng. 50: 514-520.
- Hoffbrand, A.V., y Pettit, J. E., 1991. *Hematología básica*. Ed. Noriega Limusa. 17-21.
- Hoogerbrugge, P. M., Van Beusechem, V. W. Kaptein, L. C. M., Einerhand, M. P. W., y Valero, D., 1995. *Gene therapy for adenosine deaminase deficiency*. Br. Med. Bull. 51(1): 72-81.
- Hossle, J. P., Grez, M., Schneider, S., Barbey, C., Rusconi, S., Schaffner, W., y Seger, R. A., 1995. *Towards a genetic therapy of chronic granulomatous disease*. Abstract S03-05. EXPERIENTIA 51. A5.
- Knudtzon, S., 1974. *In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood*. Blood 43: 357-361.
- Kohli-Kumar, M., Shahidi, N. T., Broxmeyer, H. E., Masterson, M., Delaat, C., Sabrano, J., Morris, C., Auerbach, A. D., y Harris, R.E., 1993. *Hematopoietic stem/progenitor cells transplant in Fanconi anemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells*. B.J. Haematol. 85: 419-422.
- Koller, R. M., Bender, G. J., Papoutsakis, E. T., y Miller, M. W., 1992. *Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors*. Blood 80 (2): 403-411.
- Koller, R. M., y Palsson, B. O., 1993. *Tissue engineering: reconstitution of human hematopoiesis ex vivo*. Biotechnol. bioeng. 42: 909-930.
- Koller, M. R., Bander, J. G., Miller, y W. M., 1993a. *Expansion of primitive human hematopoietic progenitors in a perfusion bioreactor system with IL-3, IL-6 and stem cell factor*. Bio/technol. 11: 358-363.



- Koller, M. R., Emerson, G. S., y Palsson, O. B., 1993b. *Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cell in continuous perfusion cultures*. Blood 82 (2): 378-384.
- Koller, R. M., Palsson, M. A., Manchel, L., y Palsson B. O. 1995a. *Long-term culture- initiating cell expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects*. Blood 86 (5): 1784-1793.
- Landsorp, P. M., Dragowska, W., y Mayani, H., 1993. *Ontogeny- related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells*. J. Exp. Med. 178: 781-791.
- Levee, M. G., Lee, G. M., Paek, S. H., y Palsson, B. O., 1994. *Microencapsulated human bone marrow cultures: a potential culture system for the clonal outgrowth of hematopoietic progenitor cell*. Biotechnol. Bioeng. 43: 734-739.
- Levenspiel, O., 1987. *Ingeniería de las reacciones químicas*. Editorial reverté. 107,108.
- Luft, T., Pang, K. C., Thomas, E., Bradley, C. J., Savoia, H., Trapani, J., y Cebon, J., 1998. *A serum-free culture model for studying the differentiation of human dendritic cell from adult CD34⁺ progenitor cells*. Exp. Hematol. 26(6): 489-500.
- Mayani, H., Guilbert, L. J., Janowska, y Wieczorek, A., 1992. *Biology of hematopoietic microenvironment*. Eur. J. Haematol. 49: 225-233.
- Mayani, H., Dragowska, y Landsorp, P. M., 1993. *Cytokine- induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells*. Blood 81 (12): 3252-3258.
- Mayani, H. y Landsorp, P. M., 1994. *Thy -1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from purified cord blood precursor cells*. Blood 83 (9): 2410- 2417.
- Mayani, H., Gutierrez, M., Espinoza, L., López- Chalini, E., Huerta, A, Flores, E., Sánchez, E., Luna, F., Valencia, I., Benítez, L., y Ramírez, O.T., 1998. *Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long term cultures established from umbilical cord blood cells*. Stem Cells 16: 127-135.
- Mc Adams, T. A., Winter, J. N., Miller, W. M., and Papoutsakis, E. T., 1996a. *Hematopoietic cell culture therapies (part II) clinical aspects and applications*. Tibtech. 14: 388-396.
- McKenna, H. J., Vries, P., Brasel, K., Lyman, S. D., y Williams, D.E., 1995. *Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells*. Blood 86(9): 3413-3420.
- Nash, R., y Storb, R., 1996. *Graft- versus- host effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: GVHD and GVL*. Immunol. 8: 674-680.



- Peng, C.A., y Palsson, B.O., 1996. *Determination of specific oxygen uptake rates in human hematopoietic cultures and implications for bioreactor design*. Ann. Biomed. Eng. 24: 373-381.
- Piacibello, W., Saravio, F., Garetto, L., Severino, L., Bergandini, D., Ferrario, J., Fagioli, F., Berger, M., Aglietta, M., 1997. *Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic cells for adoptive immunotherapy using a computer-controlled stirred-tank bioreactor*. J.Hematotherapy. 5: 475-483.
- Pipia, C. G., y Long, M. W., 1997. *Human hematopoietic progenitors cell isolation based on galactose-specific cell surface binding*. Nat. biotechnol.15: 1007-1011.
- Ramírez, O. T., y Mutharasan, R., 1990. *Cell cycle and growth phase dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures*. Biotechnol. Bioeng. 36: 839-848.
- Ramírez, O. T., y Mutharasan, R., 1992. *Effect of serum on the plasma membrane fluidity of hybridomas: An insight into its shear protective mechanism*. Biotechnol. Prog. 8: 40-50.
- Rich, I., y Kubanek, B., 1982. *The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells in vitro*. B.J. Haematol 52:579-588.
- Roy, V., y Verfaillie, C. M., 1997. *Soluble factor (s) produced by adult bone marrow stroma inhibit in vitro proliferation and differentiation of fetal liver BFU-E by inducing apoptosis*. J.Clin. Invest.100 (4): 912-920.
- Sachs, D. H., 1996. *Transplantation*. Immunol.8: 671-673.
- Saito, H., Ebisawa, M., Tachimoto, H., Shicchijo, M., Fukagawa, K., Matsumoto, K., Likura, Y., Awaji, T., Tsujimoto, G., Yanagida, M., Uzumaki, H., Takahashi, G., Tsuji, K., y Nakahata, T., 1996. *Selective growth of human mast cells induced by steel factor il- 6, and prostaglandin e₂ from cord blood mononuclear cell*. J. Immunol. 157: 343-350.
- Santa Olalla, T. J. 2009. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Medicina, Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular "Dr. Ruy Pérez Tamayo" Hospital del Niño Morelense. Comunicación personal.
- Sardonini, C. A., y Wu, Y. J., 1993. *Expansion and differentiation of human hematopoietic cells from static cultures through small-scale bioreactors*. Biotechnol. Prog.9: 131-137.
- Thomas, R., y Lipsky, P. E., 1996. *Dendritic cells: origin and differentiation*. Stem cells 14 (2): 196-206.
- Thompson, C., 1995. *Umbilical cords: Tuning garbage into clinical gold*. Science 268:805-807.



-
- Tiscareño, L.F., 2008. *Reactores Químicos con Multireacción*. Editorial Reverté. 161, 164,165, 192,241,325,361.
- To, L. B., Haylock, D. N., Simmons, P.J., y Juttner, C.A., 1997. *The biology and clinical uses blood stem cells*. Blood 89 (7): 2233-2258.
- Touraine , J. L.,1992. *Rationale and results of in utero transplants of stem cells in humans*. Bone marrow transplant. 10(1): 121-126.
- Valerio, G., Di Maio, S., Salerno, M., Argenziano, A., Badolato, R., y Tenore, A., 1997. *Assessment of red blood cell indices in growth-hormone-treated children*. Horm. Res. 47(2):62-66.
- Verfallie, C. M., 1992. *Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells*. Leukemia 10: 498-504.
- Verfallie, C.M., 1993. *Soluble factor produced by human bone marrow stroma increase cytokine induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminaldifferentiation*. Blood 82 (7) :2045-2053.
- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Ogawa, M., Leary, A. N., Kearney, J., y Buck, D. W., 1997. *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood 90 (12):5002-5012.
- Zandstra, P. W., Eaves, C. J., y Piret, J. M., 1994. *Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactor of normal human bone marrow cell*. Bio/ technol. 12: 909-914.
- Zannettino,A. C. W., Bühring, H. J. , Niutta, S., Watt, S. M., Benton, M. A., y Simmons,P.J., 1998. *The siamolucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis*. Blood 98 (2): 2613-2628.