



Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas

ISSN: 1870-0195

rmcf@afmac.org.mx

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

México

Tavira Montalván, Carlos Alberto; Ortega García, Angélica; Dávila González, Idalia; Estrada Mondaca, Sandino; Meneses Acosta, Angélica

Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica

Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 40, núm. 4, octubre-diciembre, 2009, pp. 35-46

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912962006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Revisión Bibliográfica

Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica

Animal cell culture in pharmaceutical biotechnology: research and perspectives

Carlos Alberto Tavira Montalván¹, Angélica Ortega García¹, Idalia Dávila González¹,
Sandino Estrada Mondaca², Angélica Meneses Acosta¹

¹Facultad de Farmacia. Universidad Autónoma del Estado de Morelos

²Saint-Gobain México, S.A. de C.V. Gerencia de Calidad

Resumen

En la actualidad, el cultivo de células animales es uno de los sistemas más utilizados en la producción de biofármacos ya que ha demostrado tener ventajas con respecto a la expresión de proteínas recombinantes en bacterias u otros organismos eucariotes, tales como levaduras o cultivos de células vegetales. Sin embargo, su utilidad no es conocida totalmente dentro del ámbito farmacéutico ya que ha sido considerado como un sistema de producción costoso, de bajo rendimiento y difícil de manipular. Por ello, en esta revisión se presenta de manera general el desarrollo de los cultivos de células animales como sistemas productores de biofármacos y se hace hincapié de sus ventajas y limitantes así como en las aplicaciones actuales y futuras de este sistema dentro de la industria biofarmacéutica.

Abstract

Animal cell culture is one of the most important systems used for the production of biopharmaceuticals. It has important advantages compared to bacterial, yeast and plant cell expression systems. However, it is not widely utilized in the pharmaceutical industry owing to the high cost, difficulties and low yield associated with its use. This review focuses on the use of animal cell culture as an alternative producing system for biopharmaceuticals and highlights its advantages, restrictions and applications in the biopharmaceutical industry.

Palabras clave: cultivo de células animales, biotecnología farmacéutica, proteínas recombinantes.

Keywords: animal cell culture, pharmaceutical biotechnology, recombinant proteins.

Correspondencia:

Dra. Angélica Meneses Acosta
Facultad de Farmacia
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa
CP 62010 Cuernavaca, Morelos
Teléfono: (52) (777) 329 7000. Ext 336
e-mail: angelica_meneses@uaem.mx

Fecha de recepción: 6 de enero de 2009
Fecha de recepción de modificaciones: 14 de febrero de 2010
Fecha de aceptación: 15 de febrero de 2010

Introducción

La célula, considerada como la unidad estructural básica de la vida constituye a todos los organismos vivos¹. Los organismos multicelulares superiores están formados por diferentes tipos de células eucarióticas, las cuales tienen diversos tamaños, formas y funciones especializadas, y, cuya coordinación y función específica lleva al desarrollo de los mismos mediante la formación de tejidos y/u órganos, para dar como resultado un organismo más complejo con capacidades mayores a las de sus componentes^{2,3}. La sobrevivencia del organismo completo depende de la coordinación del metabolismo de millones de células, las cuales individualmente llevan a cabo funciones específicas tales como: 1) **Nutrición**, la cual se basa en la síntesis de sustancias primordiales para el metabolismo primario a partir de los nutrientes obtenidos del exterior; 2) **Relación intercelular**, en la cual las células interactúan y se comunican entre sí a través de señales que determinan la función del tejido, y 3) **Reproducción**, la cual permite la multiplicación a partir de una célula precursora trayendo como consecuencia la obtención de células hijas con información genética semejante a sus progenitoras. Esta última función se caracteriza por poseer memoria^{2,3,4}. Estas similitudes fundamentales entre los diferentes tipos de células proporcionan un marco común para la biología celular, permitiendo que los principios básicos puedan ser extrapolados y generalizados a otros tipos de células. Es por ello que diversos tipos de células y organismos son extensamente utilizados en cultivos celulares debido a su fácil crecimiento y manipulación experimental^{2,4}.

Cultivo de células animales es el término general que se le ha dado al aislamiento de un tipo específico de células provenientes de tejidos u órganos animales, que posteriormente son colocadas en un ambiente artificial que favorece su división, crecimiento, multiplicación y en algunos casos, diferenciación⁵. El cultivo de células animales ha permitido estudiar la actividad intracelular, los flujos metabólicos, las interacciones con el medio ambiente, las interacciones célula-célula, la genética y la generación de metabolitos de interés⁵. Estos principios básicos han sido aplicados en muy diversas disciplinas de las ciencias naturales, abarcando desde la biología celular, biología del desarrollo y la fisiología (donde la generación de conocimiento básico está relacionada con la estructura y función celular) hasta ciencias como la toxicología y farmacología (donde el conocimiento es aplicado a las ciencias farmacéuticas).

Por otra parte, el uso de cultivos celulares animales dentro de la biotecnología farmacéutica se ha incrementado en los últimos años, ya que éstos permiten la producción de manera casi exclusiva de biológicos y biofármacos complejos (tales como vacunas tradicionales y recombinantes, proteínas recombinantes glicosiladas, anticuerpos monoclonales, vectores virales para terapia génica, etc.). Esto es debido a que brindan dos características fundamentales para la actividad de un biofármaco como

son el plegamiento correcto de las proteínas y la glicosilación compleja, además de que es posible que secreten el biofármaco al medio de cultivo. Además, la generación *in vitro* de órganos y tejidos (ingeniería de tejidos) cuyo potencial económico está rebasando las expectativas en los últimos años está marcando otra línea divisoria en el tratamiento de trasplantes y medicina reconstructiva⁶.

Por ello, y dada la importancia de este tipo de cultivos dentro del área farmacéutica, en esta revisión se presentan los aspectos fundamentales del cultivo de células así como su aplicación para la producción de biológicos y biofármacos de alto valor agregado.

Historia del cultivo de células animales en la producción de biológicos y biofármacos

Los orígenes del cultivo de células animales se remontan a mediados del siglo XIX, donde el desarrollo de las técnicas microbiológicas y del cultivo de bacterias empezaron a ofrecer a los científicos de aquella época la posibilidad y la visión de realizar cultivos de cepas específicas de manera aislada. No obstante la historia "formal" de éste comenzó a finales del siglo XIX cuando se hicieron los primeros intentos para promover el crecimiento de órganos de diferentes animales sumergiéndolos en fluidos biológicos. Sin embargo, no es hasta 1907 cuando se considera al cultivo celular como un método para estudiar el comportamiento de las células animales independientemente de las variaciones sistémicas⁷. En estos años se realizaron los primeros experimentos exitosos para mantener viables ciertos conjuntos de células no disgregadas o explantes de diferentes tejidos, pero el crecimiento solamente se limitó a la migración de células desde el tejido con la ocasional presencia de mitosis^{7,8}.

A partir de la década de 1920 se inició el subcultivo de fibroblastos, pero no es hasta 1943 cuando se estableció la primera línea celular continua de fibroblastos de ratón⁹. En 1952 se generó la primera línea celular de origen humano (HeLa) a partir de un carcinoma cervical derivado de la presencia del virus de papiloma serotipo 18 siendo actualmente una de las líneas celulares más ampliamente utilizada con diferentes fines¹⁰. Lo anterior, junto con el desarrollo de otras líneas celulares en cultivo, dio pauta para iniciar la propagación viral en líneas celulares¹¹, culminando en la producción a gran escala de vacunas tales como la de la polio (1954), y, posteriormente, las de la rabia y la rubéola (1964-1969) entre otras aplicaciones¹². Dado que el cultivo de células a partir de un tejido primario se usó ampliamente en esta época y por más de 50 años, éste recibió el nombre genérico de "*cultivo de tejidos*", aunque actualmente el uso del cultivo de células dispersas de un solo linaje celular es mucho más utilizado. Innovaciones tales como el desarrollo de medios de cultivo¹³, el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización para el pasaje de células¹⁴ y el suplemento con suero fetal bovino del medio de cultivo, permitieron el desarrollo de cultivos de células animales de diferentes orígenes.

En los años 1960's se establecieron las dos líneas celulares más utilizadas para la producción de biofármacos en la actualidad, las cuales son las células CHO (Chinese Hamster Ovarium) y la línea BHK21 (Baby Hamster Kidney), la cual proviene de riñón de cría de hámster¹⁵. Sin embargo, su uso para este fin fue explotado principalmente a partir de los años 1980's. El desarrollo de diferentes líneas celulares continuas de origen linfoblástico¹⁶ empezó a reflejar los riesgos en el manejo de líneas celulares dándose a conocer la posible contaminación cruzada con células HeLa en varios linajes celulares. A partir de los años 1970's y con los logros obtenidos manipulando el ADN, los métodos que posteriormente conformarían lo que hoy conocemos como tecnología del ADN recombinante, se realizaron los primeros ensayos de transferencia de ADN en células animales¹⁷. En esta década, también se desarrolló el primer linaje celular "artificial" proveniente de células murinas denominado *hibridoma*¹⁸, el cual fue diseñado originalmente para la producción de anticuerpos monoclonales con aplicación terapéutica. Sin embargo, la presencia de virus murinos endógenos en el sistema biológico limitaron en aquella época esta aplicación, desarrollándose primeramente su uso como herramienta diagnóstica la cual es explotada ampliamente hasta nuestros días. Asimismo, se inició el estudio de la totipotencialidad de las células madre embrionarias, cuyo desarrollo actual se ve de manifiesto en la Ingeniería de Órganos y Tejidos¹⁹.

En los años 1980's, el avance en investigación básica a lo largo de décadas de estudio se puso de manifiesto cuando se identificaron los mecanismos de regulación de la expresión genética, dándose a conocer la regulación del ciclo celular, y desarrollándose líneas celulares especializadas así como los primeros cultivos para reconstitución de piel. En esta época se llevó a cabo, por primera vez, la producción de la primera proteína recombinante en células de mamífero²⁰, constituyéndose en el primer biofármaco producido por ingeniería genética en este tipo de sistemas.

A partir de la década de 1990, el incremento en la producción de biofármacos utilizando la tecnología del cultivo de células animales modificadas por medio de la tecnología del ADN recombinante aumentó de manera exponencial debido a que las proteínas recombinantes generadas en sistemas bacterianos, de levaduras ó por medio del cultivo de células vegetales no tenían la calidad requerida por la industria biofarmacéutica en comparación con el producto generado por medio del cultivo de células animales. En esta década, se ponen de manifiesto las ventajas fundamentales que ofrece la generación de biofármacos por medio de esta tecnología sobre otros sistemas de producción para la producción de proteínas de interés farmacéutico. Tales ventajas son: el **plegamiento correcto** de la proteína (la proteína traducida adquiere su estructura tridimensional correcta en el interior del retículo endoplásmico y en el citoplasma); **la glicosilación compleja** (en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi de las células animales se agregan cadenas complejas

de azúcar en sitios específicos, produciéndose la O, la S ó la N glicosilaciones, lo que brinda actividad a la proteína, dirige a sitios blanco y permite un mayor tiempo de vida media de ésta en el torrente sanguíneo), y, **la secreción del producto al medio de cultivo** en la mayoría de los casos (facilitando el proceso de purificación posterior). Así, el estudio de las condiciones, parámetros y medios de cultivo para lograr que el sistema de expresión en células animales fuera competitivo impulsó el conocimiento en el área de la bioingeniería, ayudando al diseño de nuevos tipos de reactores y modos de operación que permitieron incrementar las productividades, con lo cual los cultivos celulares se convirtieron en una alternativa para la industria biofarmacéutica. Asimismo, el uso de células de insecto como sistema de producción de proteínas recombinantes por medio de la infección con baculovirus es al día de hoy una realidad como sistema de expresión recombinante²¹.

Por otra parte, el cultivo de órganos, la ingeniería de tejidos y el cultivo de células embrionarias eran ya actividades rutinarias a finales del siglo pasado a nivel de ciencia básica. Ya en el siglo XXI, con la genómica y el desarrollo del Proyecto del Genoma Humano, se ha despertado el interés por otras "ómicas": como son la proteómica, metabolómica, farmacogenómica, transcriptómica, glicómica, interactómica, etc. La necesidad de cultivos de células animales como base ineludible de la ingeniería de tejidos, de órganos y en terapia génica, impulsa a una reconceptualización de la medicina y de la farmacia actuales. Dado que este tema marca todo un novedoso desarrollo, se considera que es materia de otro artículo por lo que no se desarrollará ampliamente aquí.

Es necesario aclarar que aún cuando en la actualidad el cultivo de células animales ha ofrecido las ventajas en la producción de proteínas glicosiladas complejas, también presenta limitantes importantes al compararlo con otros sistemas de expresión de biofármacos, tales como bacterias y levaduras recombinantes. Dichas limitantes son los largos tiempos de cultivo, ocasionados por las bajas velocidades de crecimiento; el uso de suplementos (tales como el suero de diferentes mamíferos) y medios de cultivo costosos (principalmente aquéllos que son definidos); la fragilidad de las células a los esfuerzos de corte por lo que los reactores utilizados tienen diseños especiales en los sistemas de agitación y aireación, los cuales están en constante optimización. Si bien la baja cantidad de producto obtenido por las bajas densidades celulares alcanzadas al día de hoy es una limitante parcial debido a que con el uso de sistemas en perfusión se llegan a obtener densidades celulares del orden de 1.5×10^7 cel/ml, todavía la cantidad de proteína recombinante sigue siendo menor a la generada en bacterias recombinantes, aunque el sistema de células de insecto-baculovirus es una buena alternativa cuando las proteínas a obtener no requiere glicosilaciones complejas. Otra limitante parcial es la potencial presencia de virus animales en los productos biofarmacéuticos, los cuales son principalmente

húspedes endógenos de las líneas celulares productoras, al día de hoy, este problema se ha resuelto mediante el uso de sistemas de detección viral confiables, restringiendo el uso de suplementos potencialmente contaminados como es el suero de origen animal y por la operación unitaria de inactivación viral al final del proceso de producción⁵.

Clasificación del cultivo celular

El cultivo celular se define como el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento, la supervivencia y/o multiplicación *in vitro* de células provenientes de órganos específicos o de linajes celulares tratando de conservar al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Una de estas propiedades es la capacidad de adherencia a superficies, lo que permite que las células crezcan ya sea en *monocapa* o en *suspensión*. Esta propiedad de adherencia está en general asociada con el tipo de célula de la cual derivan y depende del tipo de proteínas presentes en su superficie. Se sabe que muchos cultivos celulares se encuentran anclados a una superficie celular debido a que sintetizan proteínas relacionadas con la matriz extracelular la cual está encargada de mantener unidas a las células y posee un papel regulador sobre las mismas *in vivo*. Algunas de las macromoléculas involucradas son la colágena, la fibronectina, la laminina y el proteoglicano, las cuales establecen interacciones con las proteínas de la membrana citoplásmica de la célula, denominadas integrinas, CAMs y cadherinas. Estas proteínas además de mantener unidas a las células también participan en la transmisión de señales del exterior hacia el interior de las células. En cultivos en monocapa, la interacción de este conjunto de proteínas se da por medio de las adhesiones focales⁴.

Los *cultivos en monocapa* (Figura 1A) representan una de las formas de crecimiento *in vitro* de las células provenientes de cultivos primarios o de líneas celulares dependientes de anclaje. En general, las células que se desarrollan de esta manera son estables genéticamente y tienen una naturaleza diploide normal. La monocapa celular crece (confluencia) cubriendo la superficie de soporte hasta que se establece contacto entre las células, lo que causa que éstas detengan su crecimiento (quiescencia). Existen algunas líneas celulares que tienen la capacidad de crecer tanto en monocapa como en suspensión (células de insecto, BHK21, híbridomas), sin embargo son muy pocas las que tienen esta dualidad⁵.

El crecimiento en *suspensión* se presenta en células cuya naturaleza es de ese tipo como en el caso de células hematopoyéticas o en aquéllas que han perdido o disminuido la síntesis de proteínas de anclaje y no desarrollan el proceso de quiescencia como es el caso de algunas líneas celulares transformadas artificialmente o de células procedentes de tumores. Las células que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies pueden ser adaptadas a crecer en suspensión después de ser sometidas a una serie de subcultivos, al hacer

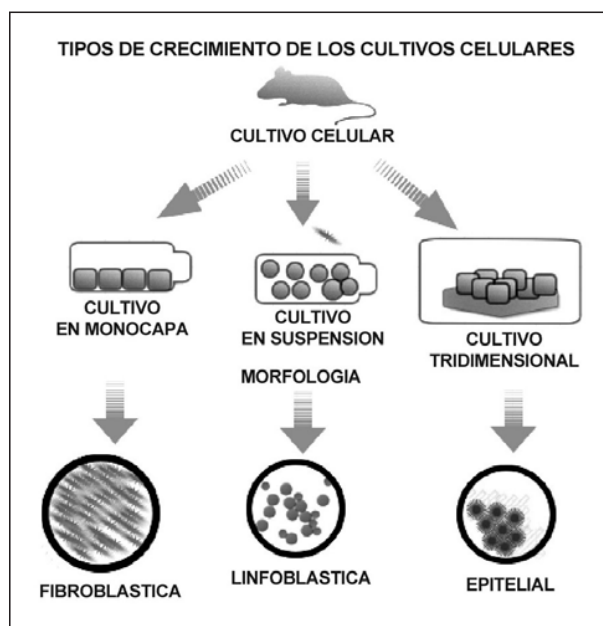


Figura 1. A) Tipo de crecimiento de los cultivo celulares. De acuerdo a las características del soporte y el origen celular, los cultivos se pueden clasificar en monocapa, en suspensión o tridimensionales. B) Esquema de las morfologías de las células en cultivo.

modificaciones genéticas o cambiando el medio de cultivo. Los cultivos continuo²¹ y de perfusión ofrecen ventajas económicas decisivas cuando se trata de aumentar la escala de operación en células en suspensión.

Con los *cultivos tridimensionales* se busca mantener la arquitectura *in vivo* del tejido de origen. En el caso del epitelio, los sistemas tridimensionales permiten estudiar la proliferación, morfología e interacciones intra e inter celulares. De igual forma se puede evaluar el efecto de sustancias que pueden afectar tales interacciones. En este tipo de cultivo es posible mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, sin embargo, la propagación celular es dependiente de las características de la biomatriz o soporte^{22,23}.

Por otro lado, el cultivo de células animales presenta principalmente tres morfologías (Figura 1B) las cuales son linfoblástica, fibroblástica y epitelial (polihédrica). Estas morfologías están relacionadas con el origen del tejido primario. Las líneas con morfología linfoblástica crecen en suspensión mientras que las dos últimas crecen en forma adherente. Sin embargo, la morfología de la célula propia depende de las características también del soporte. Es decir, cuando las células se despegan, tienden a formar esferas, sin embargo, en el momento que se adhieren vuelven a adquirir una forma específica. En biotecnología, las

líneas de origen linfoblástico, como son los hibridomas, ofrecen grandes ventajas dada su facilidad de crecer en suspensión, ya que la manipulación de ellas es mucho más sencilla. De hecho, a nivel industrial, el uso de líneas modificadas genéticamente para subsanar el problema de la adherencia ha sido muy socorrido en los últimos años permitiendo el desarrollo de líneas en suspensión con crecimiento a altas densidades celulares.

Por otra parte, el mantenimiento a corto plazo de un cultivo celular se realiza por el subcultivo del mismo en cual puede conducir a modificaciones genéticas que pueden repercutir en su fenotipo, sin embargo, esto no siempre sucede. Además, estas modificaciones también pueden ser inducidas por medio de la inserción de plásmidos específicos, lo que da origen a cultivos con diferentes propiedades. Este cambio en el fenotipo puede explotarse para un fin común considerando la maquinaria biológica de las células, abarcando desde el análisis propio de la función biológica, el estudio de enfermedades o el desarrollo de plataformas biotecnológicas para la producción de proteínas recombinantes y vacunas. Los diferentes tipos de cultivos celulares se muestran en la Figura 2.

Cultivo Primario y subcultivo. Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de algún órgano de un animal reciben el nombre de Cultivo Primario. Es decir, representa el cultivo de células de un fragmento de tejido obtenido a partir de un organismo. Estas células son consideradas como cultivo primario hasta que se subcultiven con éxito (es decir, sean transferidas, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro). Los cultivos primarios se caracterizan por estar constituidos por diferentes tipos de células (por lo que a veces pueden recibir el nombre de cocultivos) cuya morfología es predominantemente la de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide, su crecimiento *in vitro* es limitado y presentan inhibición por contacto generada por vías de señalización intra e intercelulares.

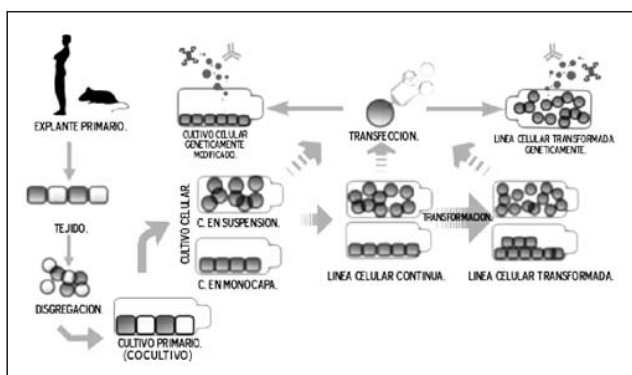


Figura 2. Diferentes cultivos celulares de acuerdo a su origen y modificación genética y fenotípica.

En el caso del aislamiento y propagación de virus silvestres, se ha observado una mayor sensibilidad de los cultivos primarios que de las líneas celulares²⁴. Anteriormente para la producción de vacunas los cultivos primarios eran recomendables por tener una baja probabilidad de que se transformaran en malignos. Su principal desventaja residía en la probabilidad de presentar virus adventicios o latentes, lo que implicó el desarrollo de tecnologías sensibles para el control de calidad¹².

El cultivo secundario se establece cuando se hace el subcultivo exitoso a partir de un cultivo primario. Las células dependientes de anclaje forman una monocapa que puede llegar a cubrir el soporte en el que crecen, el grado de cobertura del soporte se llama grado de confluencia. El subcultivo implica el desprendimiento de las células adheridas, la dilución de la densidad celular y su reinoculación en medio fresco. Las células pueden crecer a una velocidad constante en diversos subcultivos sucesivos, recibiendo cada uno de ellos el nombre relacionado con el pase. Es necesario aclarar que en este tipo de pases, el número de subcultivos no necesariamente corresponde al número de generaciones celulares por lo que siempre es importante considerar el tiempo en el que cada una de las células tarda en replicarse⁵.

Cultivo Celular. Un cultivo celular es aquel cultivo de células que tiene alta capacidad de multiplicarse *in vitro*, el cual es establecido a partir del primer subcultivo de un cultivo primario y que tiene las mismas características que el tejido de origen. Su principal característica es que tiene un número limitado de posibles subcultivos, cuyo número generalmente se encuentra entre 60 y 70 pases. Al día de hoy algunos cultivos ampliamente utilizados son los de células 293HEK o Wi38⁵.

Línea Celular Continua. Una línea celular continua consiste de células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario por medio de una pérdida de regulación debido al subcultivo continuo o mediante transfección con oncogenes, o el tratamiento con agentes carcinogénicos. Las líneas celulares continuas son aquellas que han demostrado posibilidades de ser subcultivadas *in vitro* por lo menos 70 pases indefinidamente y que presentan características genotípicas diferentes al tejido del cual fueron originadas. Las líneas celulares continuas pueden ser transfectadas con genes específicos para la producción de proteínas de interés, se les conoce como **líneas celulares transformadas genéticamente**. En general, algunas de estas líneas se caracterizan por no tener inhibición por contacto y crecer de manera indefinida e independiente del número de pases o subcultivos. Las líneas celulares más utilizadas en el ámbito farmacéutico se enlistan en la Tabla 1⁵.

Tabla 1. Líneas celulares más utilizadas en el ámbito biofarmacéutico

Línea celular	Origen	Característica
BHK21	Riñón de cría hámster Sirio	Fibroblasto dependiente del anclaje, pero puede inducirse en suspensión
CHO	Ovario de hámster Chino	Células en suspensión semejantes a las epiteliales
HeLa	Carcinoma cervical Humano	Células en suspensión semejantes a las epiteliales
IMR-90	Pulmón de embrión Humano	Fibroblasto diploide con lapso de vida limitado
L	Tejido conectivo de ratón	Fibroblastos, células en suspensión
McCoy	Origen de ratón similar a las células L	Fibroblastos dependientes de anclaje
MDCK	Riñón canino	Semejantes a las epiteliales, dependientes de anclaje
MRC-5	Pulmón de embrión Humano	Fibroblastos diploides, vida limitada
MPC-11	Mieloma de ratón	Células en suspensión semejante a los linfoblastos
Namalwa	Linfoblastoide humano	Células en suspensión semejantes a los linfoblastos
3T3	Tejido conectivo del ratón	Fibroblastos dependientes de anclaje
WI-38	Pulmón de embrión humano	Fibroblastos diploides, vida limitada
WISH	Amnión Humano	Semejantes a las epiteliales, vida limitada
Vero	Mono verde africano	Fibroblastos dependientes de anclaje

El cultivo celular y sus productos

Una de las aplicaciones más interesantes del cultivo celular ha consistido en la obtención de productos de uso terapéutico que ya han alcanzado el mercado farmacéutico. Los avances logrados en la tecnología de cultivo celular han permitido que productos cada vez más complejos se pongan al alcance del público usuario. En esta sección se presentan los diferentes productos del cultivo celular en orden creciente de complejidad del proceso involucrado. De este modo primero se abordará la producción de virus, necesarios en la fabricación de vacunas. En seguida se presentará la producción de anticuerpos monoclonales, usados como herramienta tanto diagnóstica como terapéutica. Por último, se presentará a las proteínas recombinantes, mismas

que representan productos denominados no nativos, al derivarse directamente de tecnologías de ingeniería genética aplicadas a células en cultivo.

Producción de vacunas virales

Las primeras vacunas producidas en cultivos de células de mamífero fueron aquellas contra la viruela y la fiebre amarilla en los años 1930's. El aislamiento de virus solamente pudo ser posible gracias al descubrimiento de la posibilidad de propagar células humanas *in vitro*; al control de la contaminación con antibióticos y al diseño y construcción de equipos de limpieza de aire. Altos títulos virales son alcanzados cuando los virus son crecidos en células susceptibles y, actualmente, son muchos los tipos celulares que pueden ser cultivados, adicionalmente, es más fácil inspeccionar un cultivo celular al microscopio buscando evidencias de proliferación viral, que usar huevos o animales completos. En la Tabla 2 se enlistan vacunas virales comercializadas en Europa y los Estados Unidos que se producen usando cultivos de células de mamífero. Actualmente, la disponibilidad de anticuerpos monoclonales y técnicas moleculares para la detección de ADN y ARN viral, ha facilitado la identificación de virus en procesos infecciosos, evitando las etapas de incubación en células en cultivo y permitiendo además la identificación de virus que no proliferan en cultivos tradicionales²⁵.

El desarrollo de una vacuna que podía prevenir la infección por el virus de la poliomielitis solamente pudo lograrse en cultivos, primero, *in vitro* y segundo, en células que no pertenecen al sistema nervioso central. Inicialmente, en 1908, se propagaba el virus al infectar primates sensibles. En el año 1913 se propagaba el virus al infectar tejido nervioso de primate mantenido en cultivo por 21 días²⁶. En los años que siguieron, no se había obtenido evidencia suficiente que permitiera pensar que el virus de la poliomielitis no se multiplicaba en tejido extraneural humano. En 1949, Enders en conjunto con Tom Weller y Fred Robbins, reportaron el crecimiento de virus de la polio (cepa Lansing) en cultivos extraneurales¹¹. Posteriormente, en 1952, se publicó el uso de cultivos en suspensión de piel, músculo, intestino y tejido nervioso embrionicos humanos para la propagación del virus²⁷. Adicionalmente, con adelantos tecnológicos se pudieron obtener títulos virales muchas veces superiores a los obtenidos en cultivos tradicionales. Uno de tales adelantos consistió en el desarrollo de fermentadores de 300 y 1000 litros en los que células de riñón de mono crecen sobre microacarreadores, con lo que la superficie de cultivo es incrementada²⁸. De este modo se consiguió la producción masiva de una vacuna que cambiaría la historia de la salud pública.

Una aplicación actual del cultivo de virus en células de mamífero es el diagnóstico de infecciones virales. Dicho diagnóstico es posible al buscar señales de cambios degenerativos conocidos colectivamente como efecto citopático en cultivos en monocapa de diferentes líneas celulares. El observador experto puede

Tabla 2. Vacunas virales producidas en cultivo celular y disponibles en los mercados de Estados Unidos y Europa (www.Biopharma.com)

Virus	Nombre comercial	Características
Adenovirus	Adenovirus vaccine	Oral, tipo 4. Obtenidos por cultivos en fibroblastos diploides humanos WI-38
	Adenovirus vaccine	Oral, tipo 7. Obtenidos por cultivos en fibroblastos diploides humanos WI-38
Hepatitis A	VAQTA	Formulación acuosa de virus completo inactivado proveniente de virus atenuado (con formaldehído) cultivado en células MRC-5 (fibroblastos humanos diploides).
	Havrix	Virus inactivado con formaldehído, cepa HM-175, cultivado en células MRC-5.
	Epaxal Berna	Formulación virosomal (estructura fosfolipídica similar a membrana celular) de virus de hepatitis A de la cepa RG-SB, inactivado con formaldehído y crecido en células MRC-5, estas células son adsorbidas en virosomas reconstituidos de influenza inmunopotenciadores con dos antígenos del virus de la influenza anclados a la membrana del virosoma.
	Avaxim	Virus de la cepa GBM cultivado en células humanas diploides MRC-5, inactivado con formaldehído
Hepatitis B	Hapacare-Hepagene	ADN recombinante, triple antígeno (antígeno de superficie, pre S-1, pre S-2)
Influenza	Flumist	ADN recombinante, virus atenuado adaptado al frío, vacuna trivalente A y B producida en embriones de pollo.
	CAIV-T	ADN recombinante, líquido, vacuna trivalente A y B. Virus de influenza no patogénico con proteínas de cubierta inmunogénicas de cepas epidémicas, y con el núcleo del virus atenuado por mutaciones genéticas.
	Fluvirin	Antígenos de superficie provenientes de virus cultivado en embriones de pollo, los virus se inactivan con beta-propiolactona, los antígenos se recuperan usando Triton N-101.
	Begrivac	Contiene fragmentos inactivados de tres virus causantes de influenza.
	Fluvax	Antígenos de superficie provenientes de virus inactivados de tres cepas patogénicas diferentes cultivado en embriones de pollo.
	Fluarix, Influsplit SSW, Alpharix	Virus completos cultivados en embrión de pollo, inactivados y fragmentados. Vacuna trivalente tipos A y B
Influenza	FluLaval, Fluviral	Vacuna trivalente, cultivos en embrión de pollo.
	Fluogen	Vacuna trivalente tipos A y B, antígenos de superficie de virus cultivados en embrión de pollo, extraídos con éter.
	Flu-Immune	Subviriones aislados a partir de virus cultivados en embrión de pollo.
	Flushield	Vacuna trivalente tipos A y B, antígeno del subvirión purificado por cromatografía y filtración
	Fluzone	Vacuna trivalente tipos A y B, subviriones aislados a partir de virus cultivados en embrión de pollo.
Rotavirus	RotaShield, Rotamune	Atenuado naturalmente por recombinación, administración oral, vacuna tetravalente contra los 4 serotipos más frecuentes en los EEUU, cultivado en células de riñón de mono verde africano y una línea celular de mono rhesus fetal diploide.
	Rotarix, RIX-4414	Formulación de un rotavirus recombinante natural (89-12C2) cepa G1P[8], cultivado en células VERO.
	RotaTeq, WC3	Vacuna generada a partir de un recombinante natural de cinco cepas de rotavirus. Cada uno de los recombinantes consiste del esqueleto de ARN del rotavirus bovino G6 cepa WC-3 con una inserción genética de un rotavirus humano que codifica para una proteína de superficie -ya sea VP7 de los rotavirus humanos G1, G2, G3 o G4, o bien VP4 del rotavirus humano P1A. Los virus son cultivados en células Vero.
Encefalitis japonesa	JE-VAX	Virus inactivado con formaldehído (cepa Nakayama-NIH) cultivado <i>in vivo</i> en cerebros de ratón infectado.
Sarampión	Attenuvax	Virus de la cepa Moraten propagado en cultivos de células de embrión de pollo.
Paperas	Mumpsvox	Virus de la cepa Jeryl Lynn (nivel B) cultivado en embriones de pollo.
Poliomielitis	IPOL	Virus de tres cepas (Mahoney, MEF-1 y Saukett) inactivados con formalina crecidos en células Vero.
	Poliovax	Virus de tres cepas (Mahoney, MEF-1 y Saukett) inactivados crecidos en células MRC-5.
	IPV	Virus de la poliomiélitis inactivado cultivado en células Vero.
Rabia	Imovax	Virus de la cepa Pitman-Moore (PM 1503-3M) cultivados en células MRC-5 e inactivado con beta propiolactona
	Rabie-Vax, Imovax	Virus inactivado con beta propiolactona cultivado en fibroblastos humanos diploides MRC-5
	RVA	Virus inactivado cultivado en células pulmonares de mono rhesus fetal (FRhL-2)
	RabAvert	Virus de la cepa Flury LEP C25 propagado en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo inactivado, inactivado con beta propiolactona.
Rubeola	Meruvax II	Virus atenuado de la rubéola (cepa Wistar Institute RA 27/3) cultivado en fibroblastos humanos diploides de pulmón WI-38
Viruela	ACAM2000	Virus de la cepa Conn-Master 17633 crecido en células Vero
	Imvamune, MVA 3000	Modificación del virus no infeccioso de la cepa Ankara cultivados en fibroblastos de embrión de pollo
Varicela	Varivax II	Virus varicela zoster atenuado de la cepa OKA/Merck cultivado en fibroblastos humanos MRC-5
	Zostavax	Virus varicela zoster atenuado de la cepa OKA/Merck cultivado en fibroblastos humanos MRC-5
Fiebre amarilla	Arilvax	Virus atenuado de la cepa 17D cultivado en embriones de pollo
	YF-VAX	Virus atenuado de la cepa 17D en embriones de pollo.

emitir un diagnóstico preliminar basándose en la línea celular implicada, en el tiempo de incubación y en la magnitud del efecto citopático, aunque pruebas adicionales son necesarias para la identificación definitiva del virus (el lector interesado puede remitirse a Leland y Ginocchio, 2007, para una completa revisión de las diferentes técnicas para la identificación de virus).

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas proteicas compuestas de cuatro cadenas, dos ligeras y dos pesadas unidas por puentes disulfuro, los cuales tienen diversas funciones tales como reconocimiento y neutralización de antígenos, opsonización, presentación de antígenos a células efectoras y activación del sistema de complemento. Desde el punto de vista funcional, los anticuerpos presentan una fracción que reconoce al antígeno y otra fracción cristalizante que media funciones efectoras como la respuesta citotóxica dependiente del anticuerpo y aquella que depende del complemento. La fracción que reconoce al antígeno tiene una región variable y una región constante, la primera de estas dos es muy diversa en virtud de la variedad de antígenos, la segunda permite la estabilización de la fracción variable. Los anticuerpos son producidos por células B del sistema inmune y responden a un solo determinante antigénico.

Los anticuerpos son herramientas muy importantes de la investigación científica al poderse localizar, identificar y cuantificar niveles de expresión de productos génicos, se han usado también en la caracterización y tipificación de células particulares;

mediante su uso, se pueden también conocer interacciones moleculares y celulares. En la práctica clínica, los anticuerpos son útiles en diagnóstico y tratamiento de padecimientos²⁹.

La producción de anticuerpos monoclonales (provenientes de una sola clona de linfocitos B) surgió con la tecnología creada por Milstein y Köhler en 1975¹⁸ que permitió la fusión de linfocitos B, productores de inmunoglobulinas específicas, con células de mieloma tumoral que se encuentran permanentemente en crecimiento. Con esta fusión se obtienen los hibridomas que crecen de manera casi ilimitada produciendo anticuerpos específicos contra un antígeno particular. Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular la producción de hibridomas ha llegado más lejos y se han logrado reducir las respuestas de rechazo que se producen cuando los anticuerpos son producidos en ratón. Con el objeto de reducir el rechazo, se incluyen secuencias humanas en los anticuerpos, en un proceso que se ha llamado quimerización, a pesar del cual el 40% de los anticuerpos quiméricos producen cierto tipo de rechazo²⁹. El siguiente paso tecnológico ha consistido en la humanización de los anticuerpos, una etapa importante en este proceso fue el establecimiento en Cambridge de una línea de hibridoma totalmente humana³⁰.

La mayoría de los anticuerpos comercializados (Tabla 3) son producidos por dos vías, usando tecnología de ADN recombinante en células de mamífero (como las CHO) o células linfoides murinas (como NSO, Sp2/0-Ag14), o bien en hibridomas³¹.

Tabla 3. Anticuerpos producidos usando células de mamífero cultivadas, y comercializados en los EE UU y en Europa (www.Biopharma.com)

Antígeno	Nombre Comercial	Características
CD11a	Efalizumab-Raptiva	Anticuerpo monoclonal recombinante usado en el tratamiento de psoriasis
CD20	Rituximab-Rituxan	Anticuerpo monoclonal quimérico recombinante para el tratamiento de linfoma tipo no-Hodgkin agresivos, usado también para el tratamiento de artritis reumatoide
	Ibritumomab Tiuxetan-Zevalin	Anticuerpo monoclonal recombinante antineoplásico, conjugado radio inmune para el tratamiento de linfoma folicular
CD33	Gemtuzumab ozogamicin-Myotarg	Tratamiento de leucemia mieloide aguda, anticuerpo recombinante humanizado conjugado con citocina calicheamicina
CD52	Alentuzumab-Campath	Tratamiento de leucemia linfocítica crónica de células B. Anticuerpo monoclonal recombinante de rata humanizado
CTAA16.88	Votumumab-HumaSPECT	Anticuerpo monoclonal conjugado con tecnecio 99 (Tc99m) para el tratamiento de cáncer
Epidermal Growth Factor receptor (EGFr)	Cetuximab-Erbitux	Anticuerpo monoclonal quimérico recombinante expresado en células mieloides murinas transformadas. Usado para el tratamiento de tumores que expresan EGFr. Se une específicamente al extremo N-terminal del receptor celular del EGF.
	Panitumumab ABX-EGF	Tratamiento de estados avanzados de cáncer colorectal. Anticuerpo monoclonal humano específico para EGFr, expresado en células CHO
Receptor de Her2	Trastuzumab-Herceptin	Anticuerpo monoclonal humanizado producido en células CHO que se une al dominio extracelular del receptor tipo 2 del factor epidérmico de crecimiento humano (HER-2) expresado por el proto-oncogen c-erbB2
Inmunoglobulina E	Omalizumab-Xolair	Anticuerpo monoclonal glicoproteico recombinante humanizado, específico para inmunoglobulina E humana. Expresado en células CHO. Tratamiento de asma
Integrina	Natalizumab-Tysabri	Anticuerpo monoclonal murino humanizado expresado en células de mieloma murino. Específico para integrina alfa 4 beta 1 y alfa 4 beta 7. Tratamiento de esclerosis múltiple

Antígeno	Nombre Comercial	Características
Receptor de interleucina 2	Basiliximab-Simulect	Anticuerpo monoclonal glicoproteico quimérico (humano-murino) específico para la subunidad alfa del receptor de interleucina 2 de alta afinidad, expresado en células de mieloma murino. Usado como agente inmunosupresor
	Daclizumab-Zenapax	Anticuerpo monoclonal glicoproteico quimérico (humano-murino) específico para la subunidad alfa del receptor de interleucina 2 de alta afinidad, expresado en células de mieloma murino. Usado como agente inmunosupresor
LFA-3/IgG1	Alefacept-Amevive	Proteína de fusión conformada por el antígeno 3 asociado a la función leucocitaria y la inmunoglobulina G humana. Selecciona como blanco a las células T con memoria. Tratamiento de psoriasis
Plaquetas	Abciximab-ReoPro	Fragmento de un anticuerpo monoclonal glicoproteico quimérico /humano-murino) producido por la línea celular de mieloma murino Sp2/0. Específico contra el receptor glicoproteico IIb/IIIa del fibrinógeno en plaquetas humanas, inhibiendo agregación de plaquetas
Respiratory sincitial virus (RSV)	Palivizumab	Anticuerpo monoclonal glicoproteico recombinante humanizado específico contra un epítopo en el sitio antogénico A de la proteína de fusión de RSV. Expresado en células de mieloma murino (NSO). Tratamiento de infecciones pulmonares causadas por RSV
Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha)	Infliximab-Remicade	Anticuerpo monoclonal glicoproteico recombinante parcialmente humanizado, específico contra TNF-alpha humano. Producido en la línea celular c168A. Tratamiento de procesos inflamatorios en los que TNF está implicado
	Adalimumab-Humira	Anticuerpo monoclonal recombinante humano específico contra TNF-alpha. Tratamiento de los síntomas de artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn
Tumor Necrosis Factor receptor 2/IgG1	Etanercept-Enbrel	Proteína de fusión dimérica recombinante similar a anticuerpo, consistente en dos cadenas unidas covalentemente de una proteína de fusión compuesta del dominio extracelular soluble del receptor 2 de TNF (TNFR2) con la inmunoglobulina humana G1. La proteína de fusión se expresa en células CHO
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Bevacizumab-Avastin	Anticuerpo monoclonal recombinante humanizado específico contra VEGF humano. Compite e inhibe la proliferación de células endoteliales limitando la vascularización de tumores
CD3	Muromonab-CD3. Orthoclone OKT 3	Anticuerpo monoclonal murino específico contra el receptor de CD3 en la superficie de células T humanas. Usado para reducir la inmunidad natural en pacientes transplantados
CA125	Igovomab-Indimacis 125	Diagnóstico de adenocarcinoma ovárico. Específico contra el antígeno CA125 asociado a tumores humanos. Anticuerpo quimérico
CD15	Fanolesomab Neutrospec	Anticuerpo monoclonal IgM murino específico para el antígeno CD15 en membranas de granulocitos/neutrófilos humanos. Radioconjugado con tecnecio 99 para diagnóstico de apendicitis no convencional
CD20	Tositumomab-Bexxar	Anticuerpo monoclonal específico contra CD20 en la superficie de células B, conjugado con Yodo 131. Tratamiento de linfoma tipo no-Hodgkin
Carcino Embryonic Antigen (CEA)	Aratumomab-CEA-Scan	Anticuerpo monoclonal con especificidad por el antígeno carcinoembrionario, expresado en múltiples tumores. Radioconjugado con tecnecio 99m se usa en radio diagnóstico de tumores colorectales
Granulocitos	Sulesomab-Leuko-Scan	Anticuerpo monoclonal murino específico contra el fragmento Fab' de NCA-90 en granulocitos. Diagnóstico de apendicitis no clásica
Miosina	Imcicromab Pentetate-Myoscint	Fragmento Fab derivado enzimáticamente de anticuerpo monoclonal murino con especificidad por miosina. Radioconjugado con indio 111 se usa en diagnóstico de tejido cardíaco muerto
NR-LU-10	Nofetumomab-Verluma	NR-LU-10 fragmento Fab derivado enzimático de un anticuerpo monoclonal murino específico por la glicoproteína CD20 expresada en la superficie de células tumorales. Conjugado con tecnecio 99m para el radio diagnóstico de tumores
Antígeno específico prostático de membrana	Capromab Pentetide-ProstaScint	El anticuerpo monoclonal 7E11-C5.3, específico contra el antígeno prostático de membrana conjugado con indio 111 es usado para el diagnóstico de tumores prostáticos y su metástasis
Tumor-associated glycoprotein 72 (TAG72)	Satumomab Pentetide-OncoScint	Inmunoconjugado formado por un anticuerpo monoclonal murino específico por TAG72 unido a molécula queladora. Conjugado con indio 111 es usado para radiodiagnóstico de tumores que expresan TAG72
CD34	Stem cell concentration system-Isolex 300	Sistema automatizado para la selección de células troncales CD34+ usando perlas magnéticas cubiertas con anticuerpos monoclonales murinos. Uso en transplante de células troncales de sangre periférica

Una muy interesante perspectiva se abre para la producción de anticuerpos, como lo dice Nathan Blow³², los avances en genómica han revelado poco más de 20 mil genes tan sólo en el

hombre, sin embargo sólo existen anticuerpos para un escaso porcentaje de los productos de dichos genes.

Producción de proteínas recombinantes

El uso de la tecnología recombinante para la producción de proteínas tiene cerca de 20 años³³ y, hoy en día, cerca del 70% de aquellas usadas con fines terapéuticos (Tabla 4) provienen de cultivos de células de mamífero³⁴ en virtud de que son las únicas células que pueden realizar una serie de modificaciones complejas que las proteínas de interés terapéutico requieren.

Algunas proteínas glicosiladas, producidas por cultivo de células animales han constituido íconos de la tecnología recombinante, tal es el caso de los factores de coagulación, de gran importancia en pacientes hemofílicos. La eritropoyetina (EPO), la cual es ampliamente glicosilada ha tenido un gran éxito comercial al ser la citocina de mayor uso en el mundo para el tratamiento de anemias y las células CHO son las empleadas a nivel industrial. Como potenciador de la respuesta inmune, la interleucina 2 es ampliamente utilizada en pa-

cientes con VIH. Un problema nada reciente pero al que la tecnología del ADN recombinante ha podido atender de manera precisa, es la infertilidad, misma que a través de la producción de la hormona estimulante de folículos ha podido responder a las necesidades de parejas con problemas reproductivos. En la Tabla 5 se enlistan algunas de las hormonas que se comercializan en Europa y en los Estados Unidos que son producidas en cultivos de células de mamífero.

Una de las principales inquietudes que derivan de la producción en gran escala y grandes concentraciones de polipéptidos recombinantes tiene que ver con la posibilidad de agregación y de desnaturalización. Morozova-Roche y Malizauskas³⁵ llaman la atención sobre una estructura altamente ordenada, caracterizada por un núcleo de hojas beta cruzadas, adoptada por diversos polipéptidos y que comprometería la actividad de macromoléculas terapéuticas, es la estructura amiloide. Entre los productos far-

Tabla 4. Enzimas producidas en cultivos celulares y comercializadas en EE UU y Europa (www.Biopharma.com)

Enzima	Nombre Comercial	Características
Arisulfatasa B	Galsulfase-Naglazyme	N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa humana recombinante. Glicoproteína expresada en células CHO transformadas (CSL4S-342)
DNAsa	Dornase alfa-Pulmozyme inhalation solution	Deoxiribonucleasa I humana recombinante expresada en células CHO que contienen el ADN complementario de la proteína nativa humana. Usada para adelgazar las secreciones pulmonares de los pacientes con fibrosis quística
Alfa galactosidasa	Agalsidasa alfa-Replagal	Enzima glicoproteica recombinante producida en fibroblastos humanos activados. Las células productoras están transformadas con secuencias génicas promotoras que incrementan la expresión endógena de alfa-galactosidasa A. Terapias de remplazo enzimático en pacientes con enfermedad de Fabry
Beta galactosidasa	Agalsidase beta-Fabrazyme	Formulación liofilizada de alfa galactosidasa recombinante producida en células CHO transformadas
Glucocerebrosidasa	Imiglucerasa-Cerezyme	Formulación liofilizada de una forma mutada de la beta-glucocerebrosidasa humana, tiene una sola sustitución aminoacídica (His495Arg), es producida en células CHO transformadas, patrón de glicosilación modificado para exponer manosas
	Alglucerase-Ceredase	Beta glucocerebrosidasa purificada de tejido placentario humano, perfil de glicanos modificado enzimáticamente para dejar manosas terminales
Glucosidasa	Alglucosidase alfa-Myozyme	Recombinante, glicosilada, degrada glicógeno, expresada en células CHO transformadas. Tratamiento de pacientes con enfermedad de Pompe, almacenamiento en lisosomas de glicógeno parcialmente degradado
Iduronidasa	Laronidasa-Aldurazyme	Alfa L-iduronidasa humana recombinante, expresada en células CHO transformadas. Terapia de remplazo enzimático en pacientes con mucopolisacaridosis I
Proteína C activada	Drotrecogin alfa-Xigris	Proteasa de serina recombinante humana con actividad trombolítica. Expresada en células Hek293 transformadas con el ADN complementario de la proteína C zimógeno (precursor inactivo de la enzima), activada con trombina bovina
Tissue plasminogen activator (tPA)	Alteplase-Activase Cathflo Activase	Glicoproteína recombinante de cadena simple, activador del plasminógeno tisular humano tipo I, producido en células CHO transformadas. Tratamiento de infartos agudos al miocardio
	Tenecteplase-TNKase	Forma modificada de tPA con sustituciones aminoacídicas que conducen a una mayor afinidad por fibrina
Uroquinasa	Abboquinasa	Uroquinasa dimérica humana de bajo peso molecular obtenida del cultivo de células de riñón de neonato humano. Activa al plasminógeno humano a su forma fibrinolítica/trombolítica: plasmina

Tabla 5. Hormonas producidas en cultivos de células de mamífero y comercializadas en EE UU y Europa (www.Biopharma.com)

Hormona	Nombre comercial	Características
Eritropoyetina	Epogen Procrit	Eritropoyetina recombinante humana expresada en células CHO
	Epex	Glicoproteína expresada en células CHO, secuencia aminoacídica de la proteína humana
	Dynepo	Eritropoyetina recombinante humana producida en cultivos de células R223 humanas transformadas con secuencias de citomegalovirus para inducir niveles elevados de expresión de EPO
	Aranesp	Proteína estimulante de la eritropoyesis expresada en células CHO. Difiere de la EPO por tener dos sustituciones aminoacídicas y 5 sitios de N-glicosilación (EPO tiene 3) que mejoran la estabilidad metabólica de la molécula
Hormona Estimulante de Folículos (FSH)	Follistin AQ	Hormona estimulante de folículos recombinante expresada en células CHO K1 que fueron transferidas con un plásmido que contiene las secuencias de ADN de las subunidades alfa y beta de la FSH humana
Gonadotropina coriónica (hCG)	Ovidrel	Glicoproteína recombinante humana producida en células CHO transformadas. Consiste de dos subunidades unidas de manera no covalente, cadena alfa con 2 sitios de N-glicosilación, cadena beta con 2 sitios de N-glicosilación y 4 de O-glicosilación
Hormona luteinizante (LH)	Lutropin alfa-Luveris	Hormona luteinizante recombinante humana glicosilada expresada en células CHO transformadas. Glicoproteína heterodimérica con dos subunidades unidas no covalentemente, 2 sitios de N-glicosilación en cadena alfa y 1 en cadena beta
Somatropina	Saizen Zorbtive	Hormona de crecimiento humana recombinante expresada en células de tumor murino C-127 transformadas. Secuencia, estructura, propiedades, actividad y eficiencia terapéutica idénticas a la hormona humana
Hormona estimuladora de la tiroides (TSH)	Thyrogen	Hormona recombinante producida en células CHO transformadas. Glicoproteína heterodimérica con dos péptidos unidos de manera no covalente, subunidad alfa con 2 sitios de N-glicosilación, cadena beta con 1 sitio de N-glicosilación, carece de sulfatación a diferencia de la hormona nativa

macéuticos que adoptan estructura amiloide *in vitro* se encuentran la insulina, amilina, glucagon, GLP-1, calcitonina y hormona de crecimiento. Es entonces imperativo que el proceso de producción provea las condiciones que eviten la formación de amiloides, puede ser desde el diseño de la proteína misma o bien cambiando las condiciones de producción, almacenamiento y aplicación. Como ejemplo del diseño de la proteína se puede mencionar la introducción de aminoácidos hidrofóbicos, de puentes disulfuro o de sal, iones metálicos coordinados o ligandos en las áreas donde es posible que haya uniones intermoleculares estabilizantes o bien evitando las interacciones desestabilizantes³⁵. En el medio de producción es posible agregar sales o azúcares que aumentan la solubilidad de los polipéptidos.

Conclusiones

La aplicación del cultivo de células animales dentro de la biotecnología farmacéutica se ha incrementado en los últimos años ya que las ventajas ofrecidas por éste son permitir el plegamiento correcto, brindar una glicosilación compleja adecuada y totalmente relacionada con la actividad farmacológica y en el caso de su producción, secretar los productos al medio de cultivo. En la actualidad, estas ventajas permiten hacer del cultivo de

células un sistema competitivo a nivel productivo en los países desarrollados ya que por medio de él es posible obtener vacunas, anticuerpos monoclonales y proteínas recombinantes cuyo valor agregado es considerable. En México, debido a la apertura por parte de las empresas farmacéuticas para la generación de productos de origen biotecnológico es necesario brindar información básica a la comunidad farmacéutica del desarrollo de este tipo de cultivos a lo largo de la historia así como de su clasificación y usos más importantes, para facilitar la comprensión de procesos farmacéuticos que utilicen este tipo de sistemas.

Agradecimientos

A.Meneses-Acosta agradece el apoyo otorgado por PROMEP-SEP para la realización de este artículo. Asimismo, agradecemos la participación de la estudiante Anel Pérez Rodríguez (UPE-Mor) en la búsqueda de información.

Referencias

1. Mazzarello, P. 1999. A unifying concept: the history of cell theory. *Nature Cell Biology*. 1(1):13-15.

2. Cooper, G., Hausman R.E. 2006. *The Cell*. 4th Edition. Editorial ASM Press. USA. pp. 4-37.
3. Nelson D.L., Cox M.M. 2004. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 4ª Edición. MPS Publishers. USA. pp. 3- 12.
4. Alberts B., 2002. *Biología Molecular de la Célula*. 3era. Edición. Ediciones Omega. España. pp 27- 36, 166- 172.
5. Freshney R.I. 2005. *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. Ed. John Wiley. USA. pp 4-37.
6. Butler M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68(3):283- 291.
7. Harrison R.G. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 4(1):140-143.
8. Carrel A. 1912. On the permanent life of tissue outside the organism. *Journal of Experimental Medicine*. 15(1):516-528.
9. Earle W.R., Schilling E.L., Stark N.P., Brown M.F., Shelton E. 1943. Production of malignancy *in vitro*; IV: The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *Journal National Cancer Institute*. 4(3):165- 212.
10. Gey G.O., Coffman W.D., Kubicek M.T. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*. 12(1): 364-365.
11. Enders J.F., Weller T.J., Robbins F.C. 1949. Cultivation of Lansing strain of poliomyelitis in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 109(2822): 85-87.
12. Wiktor T.J., Fernández M.V., Koprowski H. 1964. Cultivation of Rabies Virus in Human Diploid Cell Strain WI-38. *Journal of Immunology*. 93(1): 353-366.
13. Eagle H. 1955. The specific amino acid requirements of mammalian cell (strain L) in tissue culture. *Journal of Biological Chemistry*. 214(2): 839-852.
14. Moscona A.A, Moscona M.M. 1952. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy*. 86(3):287-301.
15. Macpherson I., Stoker M. 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones- an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*. 16(1):147-151.
16. Moore G.E., Gerner R.E., Franklin H.A. 1967. Culture of normal human leukocytes. *Journal of American Medicine Association*. 199(8):519- 524.
17. Graham F.L., Van der Er. A.J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52(2):456-467.
18. Kohler G., Milsten C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256(5517):495- 497.
19. Illmensee K., Mintz, B. 1976. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 73(2): 549- 553.
20. Collen D., Stassen J.M., Marafino B.J.J., Builder S., De Cock F., Ogez J., Tajiri D., Pennica D., Bennett W.F., Salwa J. 1984. Biological properties of human tissue- type plasminogen activator obtained by expression of recombinant DNA in mammalian cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*. 231(1):146-152.
21. Butler M. 1991. *Mammalian cell biotechnology*. Oxford, IRL Press at Oxford University Press. Reino Unido, pp 55-58.
22. Visconti R.P., Kasyanov V., Gentile C., Zhang J., Markwald R.R., Mironov V. 2010. Towards organ printing: engineering an intra-organ branched vascular tree. *Expert Opinion Biological Therapy*. 10(3):409-20.
23. Williams D.F. On the nature of biomaterials. 2009. *Biomaterials*. 30(30):5897-909.
24. Lorenzo F.R., Tanaka T., Takahashi H., Ichiyama K., Hoshino Y., Yamada K., Inoue J., Takahashi M., Okamoto H. 2008. Mutational events during the primary propagation and consecutive passages of hepatitis E virus strain JE03-1760F in cell culture. *Virus Research*. 137(1):86-96.
25. Leland D.S., Ginocchio C.C. 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical Microbiology Reviews*. 20(1):49-78.
26. Enders, J.F. 1952. General preface to studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture. *Journal of Immunology*. 69(6):639-643.
27. Weller T.H., Enders J.F., Robbins F.C., Stoddard M.B. 1952. Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture. I. The propagation of poliomyelitis viruses in suspended cell cultures of various human tissues. *Journal of Immunology*. 69(6):645-671.
28. Blume S., Geesink I. 2000. A brief history of polio vaccines. *Science*. 288(5471):1593-1594.
29. Machado N.P., Téllez G.A., Castaño J.C. 2006. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*. 10(1):186-197.
30. Karpas A., Dremucheva A., Czepulkowski B.H. 2001. A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(4):1799-1804.
31. Birch J.R., Racher A.J. 2006. Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58(5-6):671-685.
32. Blow N. 2007. Antibodies: the generation game. *Nature*. 447(7145):741-744.
33. Baldi L., Hacker D.L., Adam M., Wurm F.M. 2007. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters*. 29(5):677-684.
34. Wurm F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 22(11):1393-1398.
35. Morozova-Roche L, Malizauskas M. 2007. A false paradise-mixed blessings in the protein universe: the amyloid as a new challenge in drug development. *Current Medical Chemistry*. 14(11):1221-1230.