

101
/

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería

**Crecimiento Volumétrico de Hepatocitos en Estructuras Basadas en
Bio-materiales Poliméricos Modificados Superficialmente**

Tesis Para Obtener el Grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Biomédica

Presenta:

Juan Odin Ramírez Fernández

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Crecimiento Volumétrico de Hepatocitos en
Estructuras Basadas en Bio-materiales Poliméricos
Modificados Superficialmente

Tesis

Para Obtener el Grado de:
Maestro en Ciencias
(Ingeniería Biomédica)

Presenta:

Juan Odin Ramírez Fernández

Asesores:

Dr. Roberto Olayo González
Dr. Rafael Godínez Fernández

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por apoyarme con la beca de posgrado durante la duración de la maestría y el proyecto de investigación.

Le agradezco también a la UAM Iztapalapa por permitirme cursar un posgrado dentro de sus instalaciones en el área de Ingeniería Biomédica.

Así como al Doctor Rafael Godínez Fernández, al Doctor Roberto Olayo González, al Doctor Juan Morales Corona, a la Doctora Concepción Gutiérrez, al Doctor Luis Gómez Quiroz, a la Maestra Karina Martínez y a la Doctora Leticia Bucio por la asesoría, apoyo y tiempo dedicado a la realización de esta tesis.

Y a un sinfín de colaboradores del CINVESTAV, del departamento de Biología experimental y del departamento de física de polímeros, que sin su ayuda y trucos que solo dan la experiencia hubiera concluido esta tesis.

Dedico esta tesis con mucho cariño a mis padres Juan Ramírez Florido y Ma. Esther Fernández Olivares y a mi hermano Gabriel Lázaro Fernández por su apoyo incondicional, paciencia, comprensión y por nunca dejarme abandonar mis proyectos.

A Esmeralda Zúñiga Aguilar que nunca me abandono y sin su apoyo incondicional, paciencia y amor, no hubiera podido concluir satisfactoriamente este proceso de mi vida que iniciamos juntos.

Y a todos mis amigos que me hicieron más amenos los ratos difíciles dentro de la escuela como Aldo, Ronald, David, Carlos (INOVA), así como fuera de ella a todos mis amigos de Fuentes de Aragón.

Índice

Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Justificación	9
Hipótesis	11
• Objetivo General	11
• Objetivos Particulares	11
Capítulo 1. Antecedentes	12
• 1.1 Aplicaciones biomédicas de los biopolímeros	14
• 1.2 Polimerización por plasma	18
Capítulo 2. Metodología	20
• Protocolo de cultivo celular	21
• Andamios tridimensionales	25
• Selección de los biomateriales	26
• Polimerización por Plasma	28
• Recubrimiento de los biomateriales	29
• Determinación de proteína por BCA	30
• Conteo de células a sembrar dentro de cada biomaterial	33
• Implantación de las células dentro de cada biomaterial y monitorear su progreso	36
• Método de tinción de Hoechst	38
Capítulo 3. Resultados	39
• Implementación de la técnica de cultivo celular	39
• Resultado de los biomateriales recubiertos	40
• Siembra de las células dentro de cada biomaterial	42
• Determinación de proteínas	43
• Presentación de los resultados finales del crecimiento volumétrico apoyado en imágenes de microscopía confocal	49
Capítulo 4. Discusión	64
Capítulo 5. Conclusiones	68
Referencias	69

Resumen

El objetivo de este trabajo es proliferar hepatocitos (células del hígado) en forma de tejido tridimensional en estructuras modificadas con depósitos por plasma de pirrol. Se presentan los resultados de cultivos tridimensionales en este tipo de materiales con diferentes cinéticas de biodegradación y diferentes tiempos de exposición en la polimerización por plasma.

Los materiales que se utilizaron se seleccionaron en base a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, de acuerdo a lo reportado en la literatura, que tuvieran además una estructura esponjosa para facilitar la proliferación de los hepatocitos; Estos fueron: PGA-PGLA (ácido Poliglicólico con ácido poli láctico Coglicólico), PGA (Ácido Poliglicólico), Colágeno compuesto, OPLA (Ácido Poliláctico abierto), Poli vinil Butier.

Para verificar el correcto funcionamiento y proliferación del cultivo celular se verificaron las condiciones morfológicas y la producción de proteínas por parte de las células sembradas. La parte morfológica y de proliferación, se registraron mediante el uso de microscopia de amplio espectro para corroborar la proliferación celular sobre el material tomando imágenes de los materiales con las células tres veces por semana, para comprobar que se estaba recubriendo el material por las células.

De las técnicas de inmunofluorescencia que sirven para teñir ciertos organelos celulares de interés, se utilizó el marcador de Hoesch, para resaltar los núcleos celulares únicamente. Con ayuda de la microscopia confocal, se obtuvieron imágenes con varios focos de profundidad para ver el material por un lado y las células teñidas de color azul por otro, para realizar una superposición de ambas imágenes. Se midió de manera indirecta la cantidad de proteínas totales que generan las células, usando una técnica cromatográfica en el sobrenadante de cultivo.

De estos estudios se concluye que obtuvimos un cultivo celular tridimensional de células hepáticas sobre andamios recubiertos de una película delgada de polipirrol tanto morfológica como fisiológicamente correctos.

Abstract

The objective of this work is, to growth hepatocytes (cells of the liver) in three-dimensional tissue in structures modified with pirrol in plasma glow discharge. We show the results of three-dimensional cultures in this materials with different kinetic of biodegradation and different exposure times in polymerization by plasma glow.

The materials that we used were chose in base of the biocompatibility and biodegradability, like were reported in the journals, so their structures were porous for the cellular growth, then we used the next materials, PGA-PGLA (Polyglycolic Acid whit Coglicolic Poyilactic Acid), PGA (Polyglycolic Acid), composite Collagen, OPLA(Open Polyactic Acid), Polivinil Butier.

To verify the correct operation and proliferation of the cellular culture, the morphologic conditions and the protein production were verified on the part of the seeded cells. The morphologic part and of proliferation, images from the materials with the cells per week were registered by means of the use of optic microscopy three times a week to corroborate the cellular proliferation on the material, to verify that the material by the cells was being covered.

The imunoflorscences techniques are used to paint cellular organs of interest, in this case was used the marker of Hoesch to illuminate only the cellular nucleus. Using the confocal microscopy, were obtained a multifocal images of the material and the painted cells in blue, therefore were superposed the images and locate the cells in the material. The total protein rate of the cells was indirectly measure using a chromatographic technique on the overflow culture.

These experiments concluded that we obtained a three-dimensional functional cellular culture of hepatic cells on covered scaffolds of a thin film of polipirrol morphological and physiologically.

Introducción

La ingeniería de tejidos es uno de los campos científicos que desde mitades del siglo XX ha reportado avances significativos en la medicina regenerativa; ya que pretende construir y diseñar tejidos (y a futuro órganos completos), para reparar o incluso llegar a sustituir órganos lesionados que han mermado su capacidad funcional, para intentar sobrellevar la insuficiente donación de órganos [1].

De naturaleza eminentemente interdisciplinaria, la ingeniería de tejidos incluye conceptos de ramas tan diversas como la biología celular, la microfabricación, la robótica y la ciencia de los materiales para diseñar los tejidos que requieran ser desarrollados.

El cultivo celular es una técnica empleada en la ingeniería de tejidos para obtener un modelo del funcionamiento in vivo de los tejidos a estudiar, este proceso permite proliferar y reproducir células de diferentes tipos de órganos, en condiciones controladas de temperatura y una mezcla de gases específica[1, 2].

La dificultad de obtener y mantener cultivos de células bacteriológicamente estériles, fue una de las limitantes en el desarrollo de esta tecnología. El descubrimiento de los antibióticos y su incorporación en los medios para cultivos celulares permitieron superar dicha dificultad; otra limitante fue el almacenamiento celular, ya que el desarrollo de la criobiología hizo posible mantener en congelación en nitrógeno líquido, a muy bajas temperaturas, células vivas por largos periodos de tiempo [3].

La mayor aplicación de los cultivos celulares in vitro ha estado tradicionalmente relacionada con las investigaciones de los virus en el terreno básico,

epidemiológico, clínico y en el desarrollo de vacunas contra enfermedades virales humanas y animales y ha reemplazado en grado altamente significativo el uso de animales de laboratorio para éstos y otros fines.

Mediante la aplicación de estos sistemas se han obtenido, a partir de células aisladas de órganos de animales, estructuras tisulares in vitro que semejan de alguna manera los tejidos de estos órganos, potencialmente utilizables para reemplazo de órganos o en terapia genética. Independientemente de los sistemas descritos, se han hecho estudios con explantes de riñón embrionario humano y de animales in vitro para establecer el papel de algunos factores de crecimiento en el desarrollo de este órgano en el embrión [4].

Uno de los puntos clave en la regeneración de órganos es desarrollar estructuras 3D que sustituyan parte del órgano dañado o actúen como vehículo para transportar células y moléculas a lugares concretos del organismo. Estos soportes se construyen con materiales distintos en función de la estructura del órgano o tejido donde se vayan a implantar. Se fabrican implantes metálicos, de cerámica, de polímeros naturales o sintéticos y compuestos, formados por varias sustancias distintas [1].

Los principales problemas a los que se enfrentan los biomateriales son, que sean biocompatibles, que cumplan ciertas propiedades mecánicas y de biodegradación. Los progresos actuales en la ciencia de los materiales están posibilitando la mejora de las utilidades clásicas de los biomateriales así como el diseño de nuevas y prometedoras aplicaciones [5].

Con el propósito de ser utilizados para remplazamiento directos de tejidos o para ingeniería y modificación de tejidos se están desarrollando materiales compuestos de unidades o bloques de materiales derivados de sustancias biológicamente naturales, incluyendo a los componentes de matriz extracelular (CME) que sirven para modelar y facilitar el funcionamiento de los tejidos. Los CME constituyen una mezcla compleja de proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos [2].

La implantación de un dispositivo (biocompatible o biodegradable) en el organismo humano, requiere que se garantice su total reconocimiento por parte del complejo sistema fisiológico, es por ello que dentro de la ingeniería de tejidos, la modificación química a nivel superficial de los implantes (poliméricos, o de otro material) ha cobrado muchísima importancia.

Actualmente existen técnicas como la radiación ultravioleta UV, plasma, "grafting" químico, etc., con el fin de introducir grupos funcionales que mejore o induzcan el total reconocimiento por parte de los tejidos de la superficie soporte y que reduzca cualquier proceso de irritación, inflamación, sensibilización, toxicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad, irritación con la sangre y otras que induzcan al rechazo del implante; es decir que incremente la biocompatibilidad a nivel de la interface biomaterial-tejido [6].

La descarga controlada en un gas produciendo un plasma se ha sistematizado y estudiado en los últimos años dando lugar a dispositivos que utilizan éste principio y se han generado una gran cantidad de investigaciones con gran potencial de aplicación. La polimerización por plasma de monómeros orgánicos es parte de este desarrollo y destacan entre sus aplicaciones las aplicaciones biomédicas. Las técnicas espectroscópicas de caracterización de plasma han sido muy utilizadas para conocer las sustancias que lo componen, también podemos obtener información acerca de las posibles reacciones que suceden durante un proceso de deposición por plasma [7].

Para ser capaz de ionizar el gas, el proceso se lleva a cabo bajo condiciones de vacío (10⁻² a 10⁻³ bar). Una vez obtenido el vacío, se introduce el gas en la cámara de tratamiento y se ioniza con la fuente de energía apropiada, causando la aceleración de electrones libres [8].

La tecnología de plasma a baja presión es superior al plasma aplicado a presión atmosférica tanto en flexibilidad de aplicación como en homogeneidad de su

tratamiento, estabilidad y reproducibilidad de resultados obtenidos. No obstante, cabe señalar que son tecnologías que se encuentran en constante cambio evolutivo con el fin de ir paliando las deficiencias tecnológicas que la técnica en sí ofrece.

El presente trabajo de tesis se encuentra dividido en 5 capítulos, de los cuales a continuación se da una breve descripción del contenido de cada uno de ellos.

En el primer capítulo, se reseñan y se explican los antecedentes y el estado del arte de las disciplinas que se usaron para desarrollar esta propuesta.

En el capítulo 2, se describe el marco teórico de la parte biológica, correspondiente a los cultivos celulares y mediciones de proteínas, así como la parte de los biomateriales que utilizaremos como andamios y su modificación superficial a partir de la polimerización por plasma, y los cálculos necesarios para desarrollar la propuesta.

En el capítulo 3, se describen los resultados obtenidos así como las consideraciones para trabajar en 3D, reportando también las técnicas de microscopia utilizadas para obtener imágenes del desarrollo celular y las comparaciones entre materiales.

La parte de la discusión de resultados se reporta en el capítulo 4 además de presentar algunas mejoras para realizar una repetición del mismo experimento y en el capítulo 5 se reportan las conclusiones obtenidas a partir de los objetivos particulares y el objetivo general.

Justificación

El nuevo campo de la ingeniería de tejidos ofrece muchas oportunidades hacia la solución del problema de trasplante de órganos. Los investigadores han intentado el uso de la ingeniería de tejidos en casos tan variados como células epiteliales de córnea precultivadas sobre matrices de hidrogeles de alcohol polivinílico, reemplazo de hígado con hepatocitos, y modificaciones a las técnicas actuales en el trasplante de dermis y epidermis para las quemaduras [1, 3].

El número creciente de pacientes que necesitan trasplante de órganos y la disponibilidad relativamente menor de donantes ha despertado la preocupación de los científicos para desarrollar alternativas a este limitado recurso. En Estados Unidos se logran apenas cerca de 3,000 donantes de hígado anualmente al tiempo que mueren 30,000 por falla hepática sin probabilidades de trasplante.

En México, la enfermedad crónica del hígado ocupa el quinto lugar como causa de muerte y aunque no existe una cifra oficial de pacientes en espera de un órgano para trasplante cada uno de los ocho grupos hospitalarios, ubicados en diferentes ciudades de la República Mexicana, que realizan esta cirugía cuentan con alrededor de 100 pacientes en sus listas de espera, por lo que aunque sólo aproximadamente, se estima que hay alrededor de 10 mil pacientes con insuficiencia hepática crónica que esperan un hígado para continuar con vida [9, 10].

La primera cirugía de hígado en el país data de 1985, desde entonces y a la fecha sólo se han efectuado poco menos de 400 trasplantes con una tasa anual de 43 trasplantes hepáticos actualmente. Esto es un número poco significativo si se considera que en 24 años en México no se ha podido realizar el mismo número de cirugías hepáticas que en Estados Unidos se llevan a cabo anualmente, cifra que asciende a los más de 300 trasplantes [11].

Una opción alternativa al trasplante de órganos, consiste en el desarrollo del hígado bioartificial ya que la diálisis hepática consiste en extraer al paciente la sangre, la cual se pasa a través de una máquina especial denominada de plasmaféresis, donde se separan las células sanguíneas del plasma. A su vez, el plasma se pasa por el biorreactor o hígado bioartificial y se limpia de las sustancias tóxicas [10].

Al mismo tiempo, los hepatocitos cultivados vierten en él las proteínas que producen, nutriendo así al plasma del paciente. Una vez que está limpio y enriquecido con proteínas, el plasma se regresa al paciente, quien de esta manera tiene la oportunidad de sobrevivir.

El doctor Mauricio Di Silvio López, jefe del Servicio de Cirugía Experimental del Centro Médico Nacional *20 de Noviembre* del ISSSTE, señala que la terapia ya ha sido probada en países europeos y en Estados Unidos con buenos resultados. La diferencia es que ahora el hígado bioartificial se probará con células humanas en lugar de células hepáticas de cerdo [10].

Los especialistas esperan que al utilizar hepatocitos humanos los resultados sean similares a los que se obtienen con hepatocitos de cerdo, lo que permitirá reforzar el cultivo de células hepáticas porcinas, ya que es más barato y es una manera de tener una fuente de células importante.

Hipótesis

Es posible inducir un crecimiento volumétrico más acelerado de las células hepáticas, mediante el uso de un sustrato modificado utilizando la polimerización por plasma.

Objetivo General

Desarrollar un sistema de crecimiento hepático volumétrico usando sustratos con polipirrol sintetizado por plasma.

Objetivos Particulares

- Estudiar los procesos de polimerización por plasma para la generación de películas delgadas con diferentes sustratos y condiciones de síntesis.
- Estudiar la morfología celular y estructural de los hepatocitos en estructuras tridimensionales.
- Comprobar la funcionalidad de los hepatocitos generados, en base a la producción de proteínas del sobrenadante y pruebas metabólicas.
- Analizar comparativamente los sustratos utilizados y modificados en base a las pruebas de funcionalidad.

Capítulo 1. Antecedentes

Los precursores de los cultivos celulares -3D- y organoides son los cultivos celulares primarios tradicionales -2D- laminares, igualmente las suspensiones de células extraídas primariamente de los tejidos. Estos deben por lo tanto ofrecer condiciones óptimas de viabilidad y esterilidad microbiana para que los supuestos órganos bio-artificiales obtenidos de ellos puedan garantizar una alta seguridad al ser introducidos en pacientes para reemplazarles un órgano insuficiente [3].

También se pueden emplear células madre, células indiferenciadas cultivadas en el laboratorio capaces de originar cualquier célula del organismo. En este caso las células madre, que no tienen ninguna característica de ningún tipo celular concreto, se pueden transformar en el laboratorio hacia las células del órgano que se quieren reemplazar. El ejemplo anterior supone que ya se conocen todas las moléculas que intervienen en este proceso para poder recrearlo en el laboratorio. Es precisamente en este punto dónde está, hoy por hoy, uno de los grandes obstáculos para el uso de este tipo de células, ya que no se conocen bien estos procesos [1].

La estrategia más completa y a la vez la más compleja es la que utiliza estructuras 3D o biomateriales, como vehículos para enviar a un punto concreto de nuestro organismo las células y sustancias químicas necesarias para su reparación. Por tanto combina todos los elementos de la ingeniería de tejidos.

A través de la historia los biomateriales han jugado un papel muy importante en los avances médicos, haciendo uso de materiales naturales, metálicos y últimamente biopolímeros o biomateriales de tercera generación, como se muestra en la figura 1.1 [4].

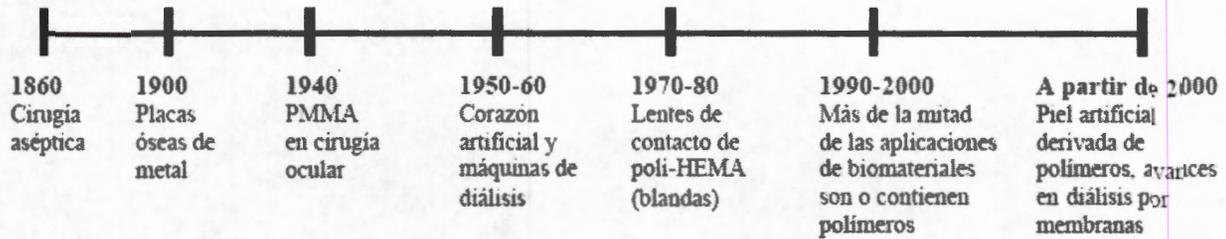


Figura 1.1. Cronología de los biopolímeros. Polímeros biomédicos utilizados a través de la historia especificando los más destacados de los mismos dentro del cuerpo humano

Al trabajar con biomateriales es necesario conocer dos aspectos fundamentales:

- El efecto del implante en el organismo, el material no debe incluir componentes solubles en el sistema vivo excepto si es de forma intencionada para conseguir un fin específico (por ejemplo en sistemas de liberación de medicamentos) [4].
- El efecto del organismo sobre el implante, el sistema vivo no debe degradar del implante excepto si la degradación es intencionada y diseñada junto con el implante [4, 5].

Las propiedades físicas y mecánicas del polímero, deben ser las más apropiadas para ejercer la función para la que han sido elegidas (por ejemplo un tendón sustituido debe tener un módulo de tensión adecuado, una membrana de diálisis la permeabilidad apropiada, una junta de cadera debe tener un bajo coeficiente de rozamiento), las propiedades mecánicas deseadas deben mantenerse durante el tiempo de vida esperado para el implante (por ejemplo no tiene que producirse una relajación significativa en un implante elastomérico) [4, 5].

El material debe ser biocompatible, siendo este concepto extensible al potencial cancerígeno que pueda poseer y a la interacción con el sistema inmunológico.

En general la mayor parte de los polímeros no satisfacen todas estas condiciones, de manera que los materiales polímeros utilizados en medicina deben de ser diseñados específicamente para cumplir unas determinadas funciones. Así se puede afirmar que es una labor que hay que realizar entre el médico, científico y el ingeniero.

1.1. Aplicaciones biomédicas de los biopolímeros

Los materiales utilizados en estas aplicaciones deben ser materiales diseñados para mantener sus propiedades en largos períodos de tiempo, por lo que se necesita que sean inertes, y debido a que su aplicación es dentro del organismo, deben ser biocompatibles y atóxicos.

Las aplicaciones más importantes son las prótesis o implantes ortopédicos, elementos de fijación como cementos óseos, membranas y componentes de órganos artificiales, entre otros. Entre los materiales más utilizados se encuentran: polímeros florados como el teflón, poliamidas, elastómeros, siliconas, poliésteres, policarbonatos, etc.

El caso de prótesis vasculares, al ser un implante expuesto al contacto con la sangre, la propiedad fundamental requerida es que el material no provoque coagulación. Considerando este requisito, se aplican fibras de PET, espumas de poli (tetrafluoretileno) expandido, poliuretanos segmentados y silicona porosa, ver figura 1.2 [8].

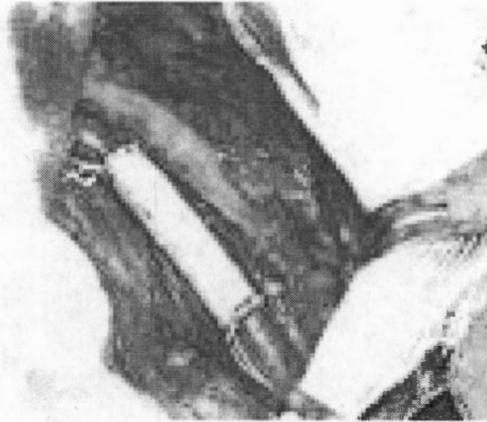


Figura 1.2. Prótesis vascular. Biopolímeros dentro del organismo, ejemplificando la biocompatibilidad y sus propiedades anticoagulantes [8]

También se han desarrollado numerosos estudios e investigaciones en el campo de implantes biodegradables que permitan solucionar las dificultades estructurales. Los polímeros o copolímeros de PLA y PGA son los más empleados para esta aplicación, gracias principalmente a su biocompatibilidad.

Por ejemplo el investigador R.J. Thomas de la universidad de Nottingham creó estructuras tridimensionales de hepatocitos con células estelares de cultivos primarios de ratas sobre andamios tridimensionales de ácido láctico [12].

Y en la universidad de York se logró Comparar el uso de diferentes andamios tridimensionales de Ácido Láctico Glicólico y de Poli caprolactona sembrando células de vejiga humana [13].

Como vimos en los ejemplos los polímeros, particularmente los biodegradables, se emplean en el campo de la ingeniería de tejidos como andamiajes temporales en los que las células pueden crecer y formar tejidos, como se muestra en la figura 1.3 [4].

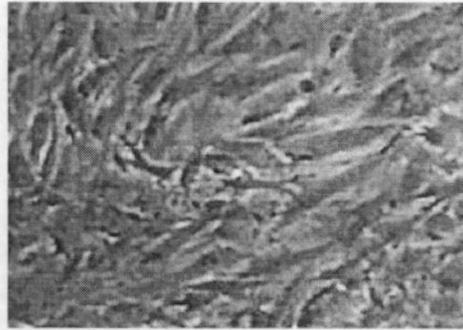


Figura 1.3. Cultivos celulares sobre superficies tratadas. Microfotografía de células musculares de conejo adheridas a la placa Petri ejemplificando un cultivo celular utilizando un andamiaje hecho a base de polímeros

En la tabla 1.1 se recoge a modo de resumen algunos de los campos de la medicina donde están más extendidas las aplicaciones de biomateriales más utilizados en el mercado.

Oftalmología	Lentes intraoculares Lentes de contacto Implantes de retina
Cardiovascular	Injertos vasculares Válvulas de corazón Marcapasos Bolsas de sangre
Reconstrucciones	Prótesis de mama Nariz, barbilla Dientes
Ortopedia	Caderas Rodillas Hombros Juntas dedos
Otros	Catéteres Oxigenadores Diálisis renales

Tabla 1.1. Campos de la medicina-aplicaciones de biomateriales con algunos ejemplos

En muchos casos las superficies de los materiales son modificadas con diferentes proteínas y factores de crecimiento que estimulan la respuesta celular, y activan los genes responsables de la diferenciación y mineralización del tejido.

A pesar de que actualmente existen diferentes polímeros biodegradables para el desarrollo de algunos andamios, el PLA, el PGA y sus copolímeros, continúan siendo los más populares y de mayor uso, como se observa en la tabla 1.2.

Polímeros sintéticos biodegradables, utilizados en Ingeniería de Tejidos

Polímero	Aplicaciones
PLA-PGA	Hueso, Cartílago
Polianhídridos	Hueso, Liberación controlada de fármacos
Poliortoéster	Liberación controlada de fármacos
Policaprolactona	Dispositivos biodegradables de fijación
Policarbonato	Hueso, dispositivos de fijación, liberación controlada de fármacos
Polifumarato	Hueso

Tabla 1.2. Polímeros sintéticos biodegradables, utilizados en ingeniería de tejidos

Las estructuras poliméricas porosas pueden ser obtenidas a través de numerosos métodos. Cada técnica de elaboración le confiere al andamio final características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio [7].

Además de las ventajas ofrecidas por el biopolímero en sí, podemos mejorar las características superficiales de los mismos, ofreciendo así una ventaja en cuanto adherencia y resistencia a la degradación que los productos estándar tienen, esto se logra por medio de procesos químicos llamados polimerización por descarga de plasma.

1.2 Polimerización por plasma

El término polimerización por plasma (PP) se usa para referirse al proceso de formar productos de alto peso molecular con ayuda de descargas eléctricas, consiste en adicionar un monómero gaseoso a un reactor, para generar mediante plasma una película polimérica sobre la superficie de sustratos. La polimerización por plasma ocurre sin necesidad de otros reactivos como agentes oxidantes o solventes, por lo que no es necesario purificar posteriormente el producto y pueden combinarse reactivos para obtener polímeros de características finales particulares depositados sobre sustratos con cualquier forma [14].

La polimerización por plasma ha sido estudiada ampliamente desde la década de 1950 y especialmente en los años 60. Llamadas películas carbonáceas y fueron preparadas por Köning y sus colaboradores en una descarga de resplandor (glow) de vapor de benceno usando un arreglo de electrodos de placas paralelas conectados a una fuente de voltaje de 50 Hz rectificadas. De acuerdo a los espectros de absorción de infrarrojo (IR) ellos no solo fabricaron hidrocarburos utilizando polimerización por plasma, sino también un polímero duro (C:H) y materiales similares a los carburos hidrogenados amorfos (a-C:H) [16].

El uso de plásticos en medicina no es nuevo, entre los polímeros más utilizados se encuentran el polimetilmetacrilato, los cementos acrílicos, los poliuretanos rígidos y reforzados, los polímeros florados, las poliamidas, los elastómeros, las siliconas, los poliésteres, policarbonatos y polímeros bioabsorbibles para suturas, los adhesivos y selladores para aplicaciones oftalmológicas, ortopédicas y dentales. Es más reciente el desarrollo de sistemas de liberación de drogas, biosensores, recubrimientos bioactivos sobre metales de uso quirúrgico, y materiales bioactivos para reparación de tipos de tejidos que anteriormente se consideraban no

regenerables como los cartílagos articulares, la producción de hueso y de tejido dentario y de mama *in vitro*.

La ionización de moléculas por colisión con electrones acelerados es el proceso esencial para crear plasma con un monómero, con o sin gas acarreador. La ionización de átomos puede ocurrir solo por la eliminación de electrones de los orbitales atómicos; la ionización de moléculas, particularmente de moléculas orgánicas es más compleja y presenta reacciones de disociación asociadas [17].

Por su baja energía térmica estos plasmas no calientan significativamente el material procesado y en algunos casos es posible el procesamiento a temperatura ambiente; en segundo lugar, la alta energía cinética de los electrones libres les permite la activación de especies químicas reactivas en fase gaseosa por colisiones inelásticas [18, 19].

Capítulo 2. Metodología

Al hacer la propuesta de realizar un crecimiento volumétrico de Hepatocitos, se debe tener en cuenta diferentes consideraciones respecto al desarrollo del proyecto que implica conocer los métodos de cultivo celular, en este caso células hepáticas humanas, los materiales que se deben utilizar y que a su vez sean biocompatibles, conocer las técnicas de polimerización por plasma así como los protocolos para medir la funcionalidad celular y algunas técnicas de microscopia que nos permitan observar de manera más clara la fijación y proliferación celular sobre los materiales utilizados, es por esto que para tomar las decisiones pertinentes en la parte experimental es necesario tener conocimiento de dichos temas, que se desglosan a continuación :

- Implementación de la técnica de cultivo celular, para proliferar los hepatocitos necesarios para los experimentos.
- Selección de los biomateriales donde se proliferaron las células.
- Recubrimiento de los biomateriales utilizando la plasmapolimerización.
- Conteo de células a sembrar dentro de cada biomaterial.
- Implantación de las células dentro de cada biomaterial y monitoreo de su progreso.
- Determinación de proteínas totales utilizando cromatografía.
- Tinción de organelos para localizar las células dentro de la estructura.
- Presentación de los resultados finales del crecimiento volumétrico apoyado en imágenes de microscopia confocal.

➤ Protocolo de cultivo celular

La línea celular con la que se trabajó, fue la línea de carcinoma hepático humano Hep G2 (ATCC No. HB-8065), estas células pueden secretar algunas proteínas como son: albumina, alpha 2-macroglobulina, alpha 1-atitripsina, transferina y plasminógeno. Además de responder a la presencia de hormonas de crecimiento humano.

El medio de cultivo utilizado para la proliferación y manutención de las células, es un coctel que tiene las siguientes proporciones:

Soluciones	Concentraciones (M)	Porcentajes (%)
Medio de cultivo Williams tipo E (Gibco 12551)	1	90
Suero Fetal Bovino (Gibco 16000)	1	8
Antibióticos y Antimicóticos (Gibco 15240)	100	1
L-Glutamina (Sigma G-1517)	0.2	1

Tabla 2.1 Medio complementado de cultivo celular. *Reactivos y porcentajes utilizados para complementar el medio de cultivo.*

El primer paso consiste en descongelar y sembrar las células HepG2, siguiendo el siguiente protocolo [15, 1, 3]:

- Calentar el medio de cultivo enriquecido en baño térmico a 37°C por lo menos 30 minutos.
- Descongelar a temperatura ambiente el criovial de células hasta que se descongele por completo.
- Limpiar la caja de cultivo de 75cm² (Nunc 156472) con etanol al 70% antes de abrirlo, rotular el frasco con tipo de cultivo, fecha, nombre de la persona encargada y número de pasaje celular.
- Agregar a la caja de cultivo 10ml del medio enriquecido, para vaciar dentro de la caja de cultivo el contenido del criovial. Cambiar el medio de la caja para quitar el DMSO después de 4 horas o cuando un número elevado de

células estén adheridas en el fondo de la caja de cultivo. (Se verá el cambio de la morfología de la célula de la forma redonda a la forma irregular).

El siguiente paso es el cambio de medio celular y el pasaje de células.

- El cambio de medio se debe hacer cada tercer día, dependiendo de la proliferación de la célula.
- Supervisar el crecimiento de las células utilizando microscopia. Prestando atención a cualquier muestra de contaminación posible del cultivo, tales como cambios medios del color y de la claridad debido al cambio de pH causado por el crecimiento de bacterias.
- Cuando la caja de cultivo alcanza el 80% de confluencia, como se muestra en la imagen 1, se debe de realizar el pasaje a cajas nuevas, empezando por retirar el sobrenadante del cultivo celular, para resuspenderlas por medio de un lavado con una solución de PBS mas EDTA (Gibco 13151-014), durante 10 minutos para romper los enlaces de calcio, luego de lo cual se retira el PBS con EDTA y a continuación se realiza la tripsinización, que consiste en agregar 2 ml. De tripsina con EDTA 1X (Sigma T3924) y dejarlo reposar durante 5 minutos dentro de la incubadora para que las células retomen su forma esferoide y agregarlas a dos cajas nuevas de cultivo previamente tratadas como se explico anteriormente para sembrar las células.

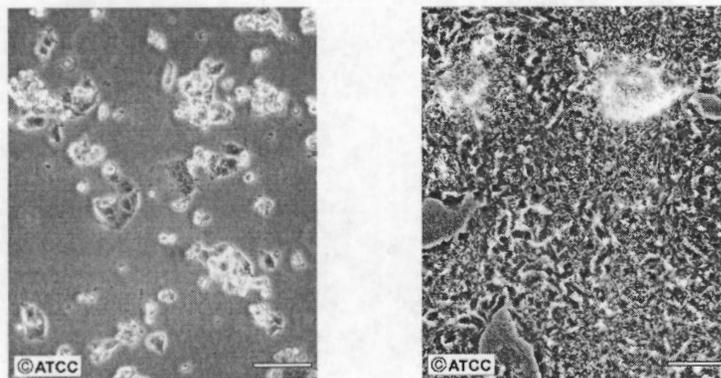


Figura 2.1 Fotos de la línea celular Hep-g2 obtenidas del catalogo de ATCC. *Del lado izquierdo se ven las células sembradas y del lado derecho las células en confluencia (80% de superficie recubierta).*

Para congelar las células se siguen los siguientes pasos:

- Se lavan los cultivos celulares con PBS mas EDTA y se tripsinizán las células mediante el método descrito y transferimos las células suspendidas con la tripsina a un tubo falcon de 15 ml.
- Sabiendo que cada criovial tiene una capacidad de 2ml. Y que dependiendo del tamaño de la caja de proliferación son los crioviales que vamos a necesitar, ya que de una caja de 75 cm² obtenemos 2 crioviales y de una de 25 cm² obtenemos 1 criovial, multiplicamos el número de cajas a congelar por los viales necesarios para prepararlos.
- Los crioviales deben prepararse con la siguiente información:
 - Línea Celular
 - Pasaje
 - Nombre de quien las congela
 - Fecha de congelación
- Luego preparamos la cámara de centrifugación donde usaremos el tubo falcon de 15 ml. Con las células obtenidas de la tripsinización, para centrifugarlo a una velocidad de 1500 RPM durante 15 minutos, o bien hasta obtener un botón de células de un color blanquecino al fondo del tubo falcon.
- A continuación se decanta el sobrenadante del tubo para dejar el botón de células únicamente y se va a rellenar con medio enriquecido, pero con la siguiente proporción:
 - Complementar el medio complementado con FBS hasta tener una concentración de 20%.
 - Y agregar DMSO (Sigma D2650) hasta obtener una concentración del 10%
 - Teniendo en cuenta que estamos trabajando con una cantidad de 2ml por criovial.

- Homogenizamos la solución con ayuda de un pipeteador para pasarlo a los crioviales previamente marcados y envolverlos con papel aluminio para introducirlos al tanque de congelación que contiene nitrógeno líquido hasta nuevo uso.

Para comenzar con el experimento fue necesario obtener una buena cantidad de las células hepáticas para trabajar, como se muestra en la figura 2.2 y 2.3, para tener un stock con el que podamos sembrar un número aproximado de 200,000 células por esponja para comenzar los experimentos.

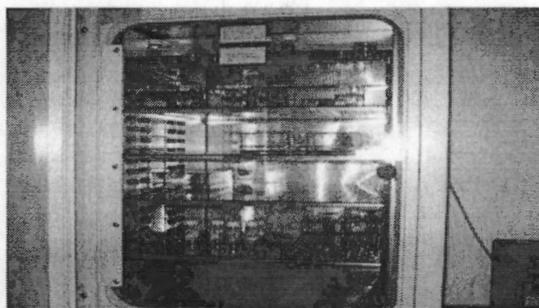


Figura 2.2 Incubadora. Almacenamiento de los cultivos celulares con condiciones similares a las del cuerpo humano



Figura 2.3 Cultivo celular de Hepatocitos. Siguiendo la técnica descrita anteriormente, se puede observar las cajas de cultivo en primer plano y el medio complementado al fondo de la imagen

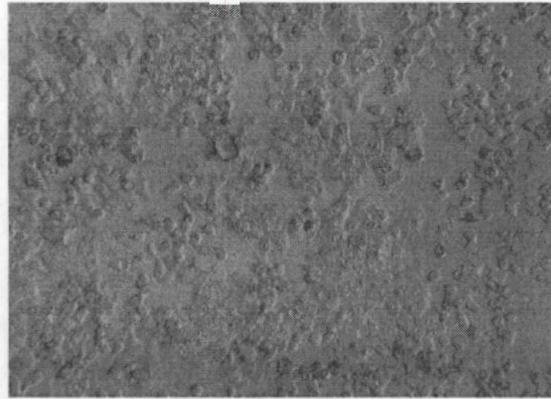


Figura 2.4 Microfotografía del cultivo de Células Hepáticas Hep-G2 (10x). *Células cultivadas en 2 dimensiones para generar el stock de trabajo*

➤ **Andamios tridimensionales**

En función del órgano que se quiera estudiar, se utiliza un “andamio” o matriz que imite la forma de ese tejido u órgano y se introducen dentro las células que van a formar ese tejido (en nuestro caso células hepáticas) como se muestra en la figura 2.5.

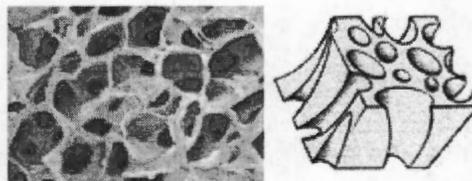


Figura 2.5 Micro-fotografía y representación de una estructura 3D de colágeno comercial que funciona como andamio tridimensional

Mientras el “andamio” aporta consistencia al órgano, las células empiezan a multiplicarse dentro por la acción de las señales químicas que favorecen su crecimiento. Poco a poco la masa de células va aumentando y va llenando el espacio libre. Las células a la vez van organizándose y adquiriendo la forma del armazón que a su vez imita la estructura del órgano. Estos soportes se construyen con moléculas permeables para permitir el paso de oxígeno y nutrientes necesarios para el crecimiento de las células. Además son biodegradables y se disuelven una vez que han desarrollado su función.

➤ Selección de los biomateriales

Después procedimos a seleccionar los biomateriales que servirían como estructuras para el sembrado de células basándonos en la literatura científica relacionada al cultivo celular de hepatocitos.

Los primeros polímeros degradables desarrollados y los más comúnmente utilizados son los obtenidos a partir del ácido poliglicólico (PGA) y del ácido Poliláctico (PLA), los cuales han encontrado una multitud de usos en la industria médica, comenzando con las suturas biodegradables que fueron aprobadas en 1960 [13, 14].

Desde entonces numerosos dispositivos basados en PGA y PLA han sido desarrollados, así como también otros materiales, como la polidioxanona, politrimetilen-carbonato en forma de copolímeros y homopolímeros y copolímeros de poli(e-caprolactona), los cuales han sido aceptados como materiales de uso biomédico. Adicionalmente a estos materiales, se encuentran los polianhídridos, los poliortoésteres y otros que actualmente se encuentran bajo investigación.

Los materiales que seleccionamos fueron los siguientes:

- ❖ Esponjas de Acido Poliglicólico (PGA)
- ❖ Esponjas de ácido láctico (OPLA)
- ❖ Esponjas de colágeno compuesto
- ❖ Esponja de Acido Poliglicólico-láctico(PGA-PGLA)
- ❖ Fibras de Polivinil butier creadas por "electro-spin"

Siendo los tres primeros materiales comerciales que se utilizaron en la bibliografía consultada debido a que permiten una correcta adherencia celular y el paso de nutrientes a través de los poros, para tener una idea más clara, se muestran fotografías de los materiales utilizados a continuación.

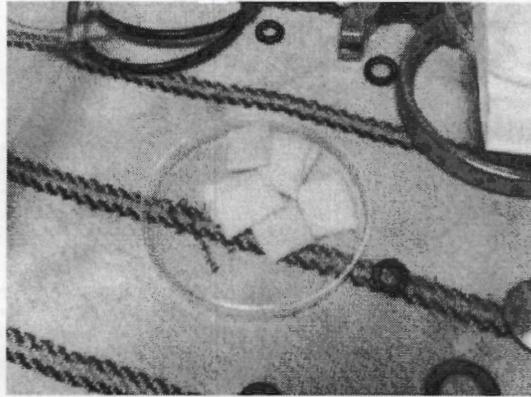


Figura 2.6 Esponjas de PGA y PGLA. Los andamios de PGA están situados en la parte inferior de la caja Petri y los de PGLA están ubicados en la parte superior de la caja



Figura 2.7 Fibras de Polivinil butier. Fibras obtenidas por la técnica de electrospinning sobre papel aluminio.

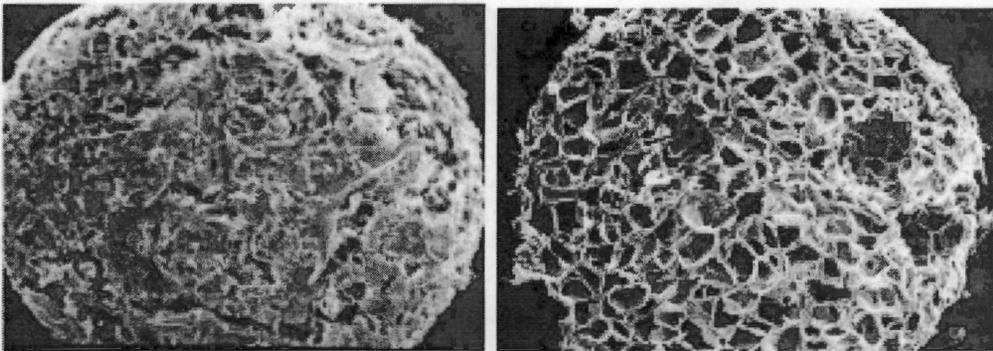


Figura 2.8 Andamios de OPLA y Colágeno compuesto. Microfotografías de esponjas de OPLA del lado derecho y Colágeno compuesto del lado izquierdo del catalogo de BD.

Los últimos dos materiales se desarrollaron por técnicas de polimerización en la UAM Iztapalapa, para el caso del PGA-PGLA se utilizo la esponja comercial de PGA para recubrirla superficialmente con su copolímero con ácido láctico PGLA,

para obtener un material compuesto que tuviera características similares al primer material.

Para el siguiente material, Polivinil butirato, se utilizó la técnica de "electrospinning", que emplea fuerzas eléctricas para producir fibras de polímeros con diámetros de alrededor de 50 nanómetros. Las nanofibras han sido utilizadas para desarrollar dispositivos de uso tópico capaces de mantener niveles terapéuticos constantes y sostenidos en el sitio de acción, por su homogeneidad y estabilidad.

El monómero utilizado fue el Butiral de Polivinilo, también conocido simplemente como Butiral (PVB), que es un compuesto químico resultado de mezclar alcohol de polivinilo con butiraldehído. El material resultante es un polímero de gran adherencia y durabilidad, utilizado principalmente en la industria del vidrio y en la medicina, como andamio para cultivos de células óseas.

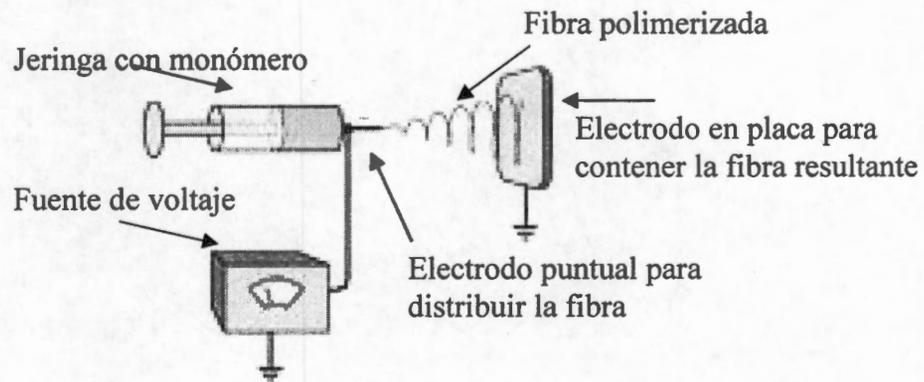


Figura 2.9 Electrospinning. Esquema general de la técnica de polimerización de electrospinning utilizada para generar las fibras de Polivinil butier.

➤ Polimerización por Plasma

La técnica de polimerización que se utilizó para este trabajo, fue la polimerización por plasma con descarga luminiscente, debido a que solo requerimos recubrir con una capa muy delgada de polipirrol nuestros andamios tridimensionales sin modificar las propiedades de los materiales a tratar.

Para ser capaz de ionizar el gas de forma cuantitativa y controlada, en el caso del plasma a baja presión, el proceso se lleva a cabo bajo condiciones de vacío (10^{-2} a 10^{-3} mbar). Una vez obtenido el vacío, se introduce el gas en la cámara de tratamiento y se ioniza con la fuente de energía apropiada, causando la aceleración de electrones libres, en la cual se deben seguir las siguientes características [19, 26]:

- Presiones reducidas (0,1-1,0MBar).

- Fuente generadora de energía: Corriente directa de baja frecuencia (50Hz), Radiofrecuencia (40kHz, 13,56MHz) o Microondas (GHz). Se aplica sobre un par de electrodos.

Al introducir gases orgánicos en el plasma, se producen productos semejantes a polímeros sobre los substratos que se encuentran en la cámara de reacción [20].

➤ **Recubrimiento de los biomateriales**

El siguiente paso consistió en recubrir con polipirrol los materiales a utilizar como andamios (de preferencia con una corta exposición y un bajo wataje), a continuación se describen los materiales utilizados, así como los tiempos de exposición y potencia utilizados en cada uno [26]:

- Esponjas de Acido Poliglicólico (PGA) exposición 1 hora a 20 watts
- Esponja de Acido Poliglicólico-láctico(PGA-PGLA) exposición 1 hora a 20 watts
- Fibras de Polivinil butier creadas por "electro-spin" 50 min 30 watts
- Esponjas de acido láctico (OPLA) 50 min a 30 watts
- Esponjas de colágeno 50 min a 30 watts
- Todas ellas con un control sin recubrimiento, a excepción de los primeros 2 materiales

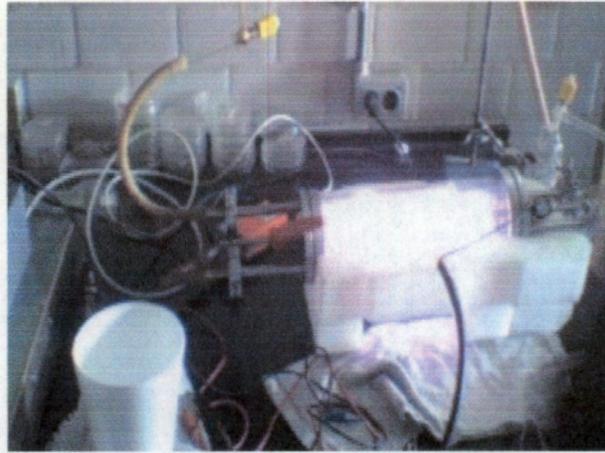


Figura 2.10 Polimerización por plasma. Reactor de plasma en funcionamiento polimerizando las esponjas que se utilizaron en los experimentos

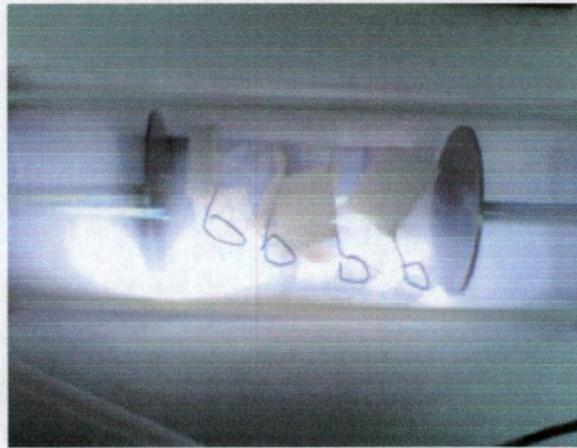


Figura 2.11 Plasmapolimerización. Esponjas seleccionadas recibiendo el tratamiento de plasma descrito anteriormente

Debido a que los polímeros obtenidos por plasma tienen una estructura química menos regular, reforzada por enlaces cruzados que los polímeros producidos en fase líquida, son ideales si se quieren utilizar para modificar únicamente la superficie del material a recubrir. Ellos tienen múltiples aplicaciones como recubrimientos tipo barrera, recubrimientos hidrófilos o hidrófobos, etc.

➤ **Determinación de proteína por BCA**

Para poder hacer determinaciones de proteínas totales, se pueden utilizar algunos kits comerciales debido a su rápida aplicación y las bajas concentraciones que pueden llegar a medir, en este trabajo se utilizó el “BCA Protein Assay kit”

(23225), que es un kit de cuantificación de proteína total que funciona por medio de la colorimetría, a 562 nm de longitud de onda, con una resolución de 20-2,000 $\mu\text{g/ml}$ [22, 25].



Figura 2.12 Kit comercial de medición de proteína BCA. *Estuche de determinación proteínica utilizando la técnica cromatográfica.*

Esto lo logra a partir de una curva estándar que se basa en diferentes concentraciones bien conocidas de albumina sélica bovina (BSA) como se muestra en la siguiente tabla:

Vial	Volumen agua desionizada [μl]	Volumen y fuente BSA [μl]	Concentración final BSA [$\mu\text{g/ml}$]
A	0	300 stock	2000
B	125	375 stock	1500
C	325	325 stock	1000
D	175	175 vial B	750
E	325	325 vial C	500
F	325	325 vial E	250
G	325	325 vial F	125
H	400	100 vial G	25
I	400	0	0

Tabla 2.2 Concentraciones proteicas estandarizadas de albumina sélica bovina

Luego, en una placa de 96 pozos se ponen 25 μl de los viales estándar para que sean nuestra referencia de datos al introducirlos al cromatógrafo con la siguiente disposición descendente:

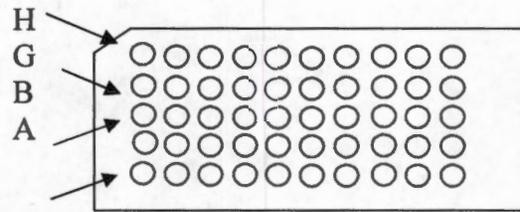


Figura 2.13 Placa de 96 pozos. Utilizada para realizar las mediciones de concentración de proteína y su disposición para meterla al cromatógrafo

A continuación se prepara la solución de trabajo (WR), que debe de tener una relación de reactivos que vienen dentro del kit con la siguiente proporción 50 partes del reactivo A por 1 parte del reactivo B.

Esto es importante dependiendo de los pozos que se van a utilizar, ya que cada uno lleva un volumen de 200 μl de WR para calcular cuánto WR es necesario para trabajar utilizando una simple regla de 3.

Después de nuestras muestras que vamos a medir debemos rellenar los pozos con 5 μl de muestra y 20 μl de agua desionizada.

Por último se agrega el WR, a todos los pozos de la caja y se deja en una incubadora reposar durante 30 minutos, para meterla después al cromatógrafo y realizar el análisis, obteniendo los valores de absorbancia de cada muestra, para después interpolarla con la curva realizada con los viales estándar.

➤ **Conteo de células a sembrar dentro de cada biomaterial**

Primero se establecieron las cantidades de células a sembrar por cada pozo por duplicado considerando 4 pozos por cada material, para determinar el número de cajas necesarias para el experimento de conteo celular.

Cantidad celular	Cantidad Celular por Num de Pozos(18)
200,000	3,600,000

Tabla 2.3 Celulas necesarias por experimento y por material

Cuadrantes para iniciar conteo celular

1	2	3
4	5	6
7	8	9

Para el conteo celular se toman 3 de los cuadrantes al azar, y debe de haber una cantidad igual aproximada de células por cuadrante

Figura 2. 14 Cuadrantes de la camara de Neubauer

Se tripsinizó la caja de cultivo celular por medio del protocolo ya establecido en capítulos anteriores. Una vez tripsinizadas las células se aplican 8ml de medio de crecimiento celular (Medio Williams), se homogeniza aproximadamente 10 veces, en caso de haber una gran cantidad celular se realiza una vigorosa homogenización. Ya homogenizadas las células se coloca 1ml del medio en una alícuota de 2,5 ml.

Se colocó un cobre objetos sobre los canales para posteriormente aplicar aproximadamente 0.1ml o 0.2ml del medio contenido en la alícuota preparada.

El conteo celular se realizó con ayuda de un contador mecánico tomando uno de los cuadrantes seleccionados (la resolución del microscopio debe de estar a 10x para asegurar una percepción completa de este), y así sucesivamente hasta haber terminado con todos los cuadrantes.

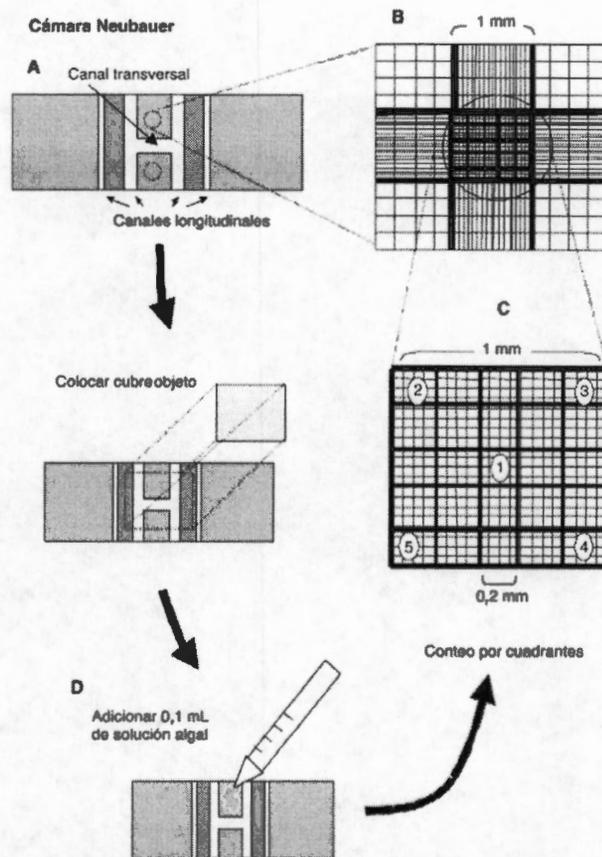


Figura 2.15 Esquema del uso de la cámara de Neubauer

➤ Cámara de Neubauer

La Cámara de Neubauer es un instrumento utilizado en cultivo celular para realizar conteo de células en un medio de cultivo líquido. Consta de dos placas de vidrio, entre las cuales se puede alojar un volumen conocido de líquido. Una de las placas posee una grilla de dimensiones conocidas y que es visible al microscopio óptico.

Para contar las células de un cultivo líquido, se agregar una gota de este entre estas dos placas y observar al microscopio óptico la cantidad de células presentes en un campo determinado de la grilla. En base a la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo de la grilla, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la solución de medio de cultivo inicial.

Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro.

A partir de los datos anteriores se procedió a separar las muestras celulares con las cantidades celulares específicas para cada esponja, obteniendo los siguientes resultados.

- Cantidad de células contadas por la técnica descrita (1° caja):

1° Cuadrante: 227 células
2° Cuadrante: 172 células
3° Cuadrante: 160 células

Total 1 : 559 células

- Duplicado del conteo de 1° Caja

1° Cuadrante: 188 células
2° Cuadrante: 128 células
3° Cuadrante: 141 células

Total 2 : 457 células

$$559/3 + 457/3 = 338.66/2 = 169.2/3 = 56.38 \cong 56.4 \text{ células}$$

$$56.4 \times 10^4 \rightarrow 1\text{ml}$$

$$X \rightarrow 10\text{ml}$$

$$\therefore X = 5.64 \times 10^6 \text{ células en la caja 1}$$

- Conteo de la 2° Caja

1° Cuadrante: 211 células
2° Cuadrante: 185 células
3° Cuadrante: 185 células

Total 1 : 581 células

➤ Duplicado del conteo de 2° Caja

1° Cuadrante: 218 células
2° Cuadrante: 232 células
3° Cuadrante: 214 células

Total 2 : 664 células

$$581/3 + 664/3 = 415/2 = 207.5/3 = 69.16 \cong 69.2 \text{ células}$$
$$69.2 \times 10^4 \rightarrow 1\text{ml}$$
$$X \rightarrow 10\text{ml}$$

$$\therefore X = 6.92 \times 10^6 \text{ células en la caja 2}$$

➤ Calculo de la cantidad de células que se necesitaran por pozo

Como tenemos 2 cajas con 6.92×10^6 y 5.64×10^6 respectivamente, utilizamos la mitad de las células de una caja y la otra mitad de la segunda caja teniendo los siguientes cálculos:

9 pozos con 200,000 células por pozo de la caja 1

$$1.8 \times 10^6 \rightarrow X$$
$$6.92 \times 10^6 \rightarrow 10\text{ml}$$
$$\therefore X = 2.601 \text{ ml} \cong 2.6 \text{ ml} \rightarrow 2.6\text{ml (cantidad celular)}/9 = 0.28 \cong 0.3 \text{ ml por pozo}$$

9 pozos con 200,00 células por pozo de la caja 2

$$1.8 \times 10^6 \rightarrow X$$
$$5.64 \times 10^6 \rightarrow 10\text{ml}$$
$$\therefore X = 3.19 \text{ ml} \cong 3.2 \text{ ml} \rightarrow 3.2\text{ml (cantidad celular)}/9 = 0.355 \cong 0.35 \text{ ml por pozo}$$

➤ **Implantación de las células dentro de cada biomaterial y monitorear su progreso**

Por último se realizó la siembra de las células en los materiales procurando distribuir de manera homogénea por todo el material las células, utilizando cajas de 6 pozos para facilitar su manipulación.



Figura 2.16 Implantación celular. Sembrado celular en las esponjas utilizando la técnica que desarrollamos y que describiremos a continuación

Para distribuir las células empleamos una pipeta de 10 ml., ya que se decidió utilizar una cantidad de 200, 000 células por material utilizado, empleando la técnica de la cámara de Neubauer, con una cantidad de 8 ml. De medio complementado, mismo que se cambio cada tercer día de cultivo.

Se utilizo el mismo protocolo de cambio de medio, incubación y lavado celular que se utiliza en los cultivos bidimensionales con sus respectivos altibajos y diferencias que discutiremos en el capítulo 4.

Para monitorear los cultivos se tomaron fotografías con los tres aumentos, cada tercer día a cada uno de los materiales durante 3 semanas, así como tomar una muestra del sobrenadante 2 veces por semana de cada material con su respectivo control para realizar una medición de proteína del sobrenadante, que reflejo la producción proteica de las células, utilizando una técnica muy similar a la de proteína total mencionada más arriba.

➤ Método de tinción de Hoechst

La identificación de algunos organelos celulares se realiza mediante técnicas de tinción que consisten en agregar ciertos químicos permeables a las células para que al utilizar un microscopio de fluorescencia los organelos que se quieran observar brillen bajo la luz emitida por el microscopio, permaneciendo oscuras todas las regiones a las que no les afectó el químico utilizado [23, 24].

En este trabajo se decidió teñir los núcleos celulares, utilizando la técnica de Hoesch, ya que además de mostrar la distribución celular dentro del andamio también sirve para identificar a las células vivas, ya que solo reacciona con núcleos celulares funcionales.

Por lo que se sigue el siguiente protocolo:

- Se deben lavar las células con PBS (solución salina estéril) a 37° C, y dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se efectúan 3 lavados de 4 minutos con PBS a temperatura ambiente.
- Luego se lavo 3 veces durante 10 minutos una solución del marcador de Hoesch a 2 mili molar en una relación 1:500 en PBS para dejar con el liquido del último lavado durante 15 minutos a 37 °C
- Por último lavar 5 veces con agua destilada y se montan sobre cubreobjetos para ser observadas en el microscopio confocal y poder realizar una reconstrucción tridimensional de los núcleos celulares sobre los materiales.

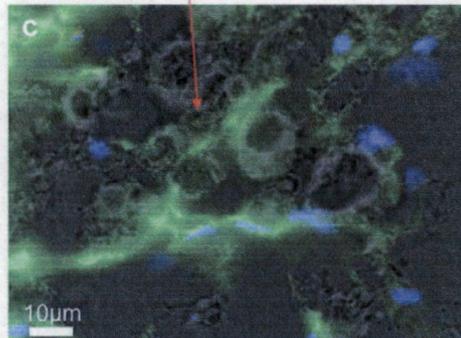


Figura 2.17 Tinción de Hoescht. *Microfotografía donde se ejemplifica el uso y los resultados de la Tinción de núcleos utilizando técnica de Hoesch [25]*

Capítulo 3. Resultados

➤ Implementación de la técnica de cultivo celular

Con la proliferación de las células generamos una reserva celular para disponer de las células en el momento en que fuera necesario, ya que por cada material a utilizar era necesario sembrar una cantidad de 200,000 células, teniendo en cuenta que cada caja de cultivo de 75 cm² al 80% de confluencia celular contienen una media celular de 8 millones de células.

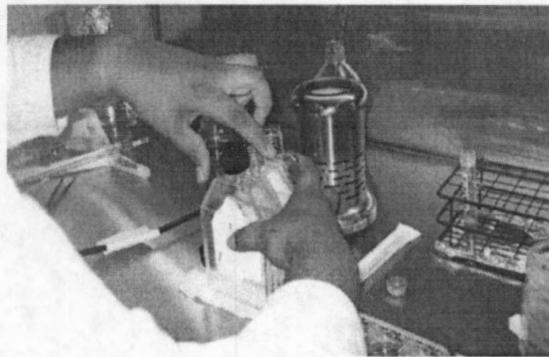


Figura 3.1 Congelación Celular. Método de congelación donde se observa cómo se extraen las células tripsinizadas de las cajas de cultivo para colocarlas en los tubos de centrifuga que se ven en la gradilla y prepararlas para introducirlas al tanque de nitrógeno líquido

Que a su vez al momento de congelar las células en nitrógeno líquido obtenemos dos crioviales de 2 ml cada uno, para tenerlos de reserva en caso de cualquier desperfecto que nos llevara a tener que repetir experimentos.



Figura 3.2 Tanque de nitrógeno. Las células se colocan en los crioviales y el medio complementado para congelarlas y preservarlas

Estas células se pueden conservar en nitrógeno para después realizar futuros experimentos que requieran la misma línea celular.

➤ Resultado de los biomateriales recubiertos

Ya que seleccionamos los materiales, los recubrimos con los tiempos de exposición y potencia descritos en el capítulo anterior dentro de un reactor de plasma para sintetizar polipirrol sobre los materiales, es una ventaja utilizar el plasma en materiales porosos debido que entra el gas ionizado por los poros y obtenemos un recubrimiento total de la superficie del material.

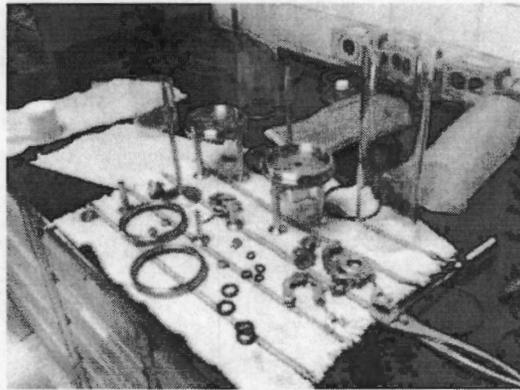


Figura 3.3 Reactor de plasma limpio y desarmado

El reactor debe estar completamente limpio, como se muestra en la figura 3.3, para evitar contaminaciones por materiales que al ser ionizados puedan liberar vapores que reaccionen con el pirrol, y que modifiquen sus propiedades superficiales, tales como cloro, partículas de jabón, etc.

El principal indicador de que se llevo a cabo el recubrimiento superficial se observa con la tonalidad final de los materiales, que adquieren un color café claro, mismo del pirrol sintetizado en polipirrol, quedando nuestros materiales como se ven en las fotos siguientes.



Figura 3.4 Andamios tratados superficialmente. Del lado izquierdo apariencia de las esponjas de colágeno compuesto recubiertas con pirrol y del derecho apariencia de las esponjas de OPLA recubiertas con pirrol

Como el Polivinil butier fue seleccionado en dos presentaciones dependiendo del espacio entre fibras, podemos observar que tienen forma de hojas de papel y que al adquirir el característico color café del pirrol, penetra por todas las fibras el polipirrol sintetizado

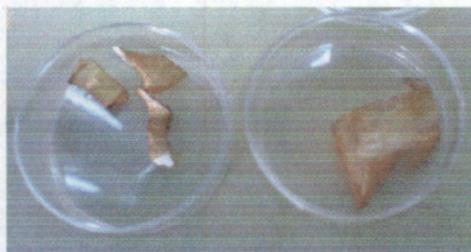


Figura 3.5 Andamios tratados superficialmente. Apariencia del Polivinil butier recubierto con pirrol del lado izquierdo fibra de poro cerrado y de lado derecho fibra de poro abierto

Por último, las esponjas de PGA y PGA-PGLA se observan en tonos más oscuros que en el Polivinil butier debido a que sus poros son más cerrados pero presentan mayor abertura que en el colágeno y el OPLA por esto son más oscuros y más rígidos al tacto debido al recubrimiento.



Figura 3.6 Andamios tratados superficialmente. Apariencia de PGA del lado izquierdo y PGA-PGLA del lado derecho recubiertos con pirrol

➤ **Siembra de las células dentro de cada biomaterial**

Una vez que tenemos los materiales y las células listas para sembrar, se seleccionaron las cajas de cultivo, que fueron cajas de 6 pozos de 10ml. Para facilitar el cambio de medio y los registros fotográficos de todos los materiales, ya que utilizamos los materiales recubiertos con pirrol y sus controles.



Figura 3.7 Sembrado de células. Colocación de las esponjas en medio complementado, para que el medio penetre dentro de las esponjas y se tengan las mismas condiciones de temperatura que se requieren para incubar

Se colocaron las esponjas primero dentro de los 8 ml. De medio complementado para adecuarlas al medio y temperatura de las células y que se impregnara todo el interior de las esponjas para sembrarle las células como se observan las imágenes en la figura 3.7.

El siguiente paso consistió en sembrar las células dentro de las esponjas, debido a que para realizar un sembrado en mono capa, únicamente se vierten las células sobre la superficie a cultivar se decidió introducir las células con una pipeta de 10 ml. Esto, con el fin de que no sufrieran daños mecánicos por ser muy pequeño el diámetro de salida de las células y que pudieran cubrir el interior de las esponjas de forma homogénea.

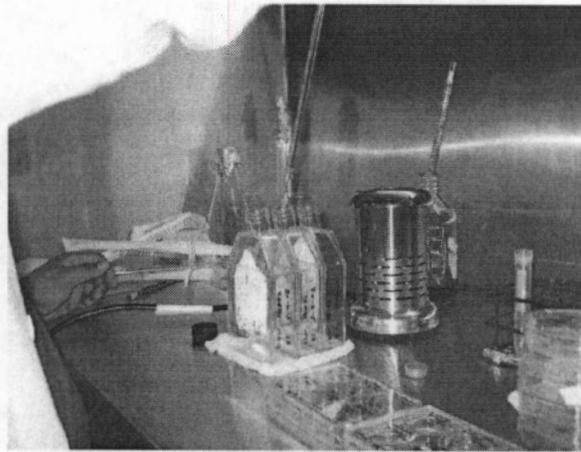


Figura 3.8 Sembrado de las células dentro de las esponjas. *Utilizando la pipeta que se observa de color azul en la parte superior de la fotografía para extraer de las cajas de cultivo las células tripsinizadas e introducirlas en las cajas de 6 pozos con los materiales*

Por último, se siguieron los pasos de incubación determinados en el capítulo anterior, esperando 24 horas para monitorear con ayuda del microscopio óptico la adherencia de los hepatocitos en las esponjas.

➤ **Determinación de proteínas**

Así como se monitoreo por medio de fotografías la morfología y adherencia celular, también fue requerido estar checando la producción de proteína de las células que vertían al medio o sobrenadante, ya que es una prueba de funcionalidad fisiológica, ya que la parte morfológica se comprobó por medio de fotografías.

Se decidió que se tomarían muestras del sobrenadante dos veces por semana, y medirles la concentración proteínica de cada material, para comenzar se deben tomar las alícuotas de los estándares a medir, esto es debido a que contienen una cantidad específica de proteínas disueltas, que al agregar las soluciones de trabajo especificadas en el protocolo correspondiente toman una coloración variable de acuerdo a la concentración determinada, y como se utiliza un cromatógrafo para medir dichas concentraciones generar una curva patrón para

después en base a esta interpolar los valores de medición obtenidos de las muestras.

	Absorbancias curva patrón	patrón sin blanco	concentración de BSA [µg/ml]	proteínas en 25µl [µg]
blanco (l)	0.0957			
H	0.0959	0.0002	25	0.625
G	0.155	0.0593	125	3.125
F	0.2045	0.1088	250	6.250
D	0.3448	0.2491	500	12.500
D	0.4564	0.3607	750	18.750
C	0.5762	0.4805	1000	25.000
B	0.7947	0.6990	1500	37.500

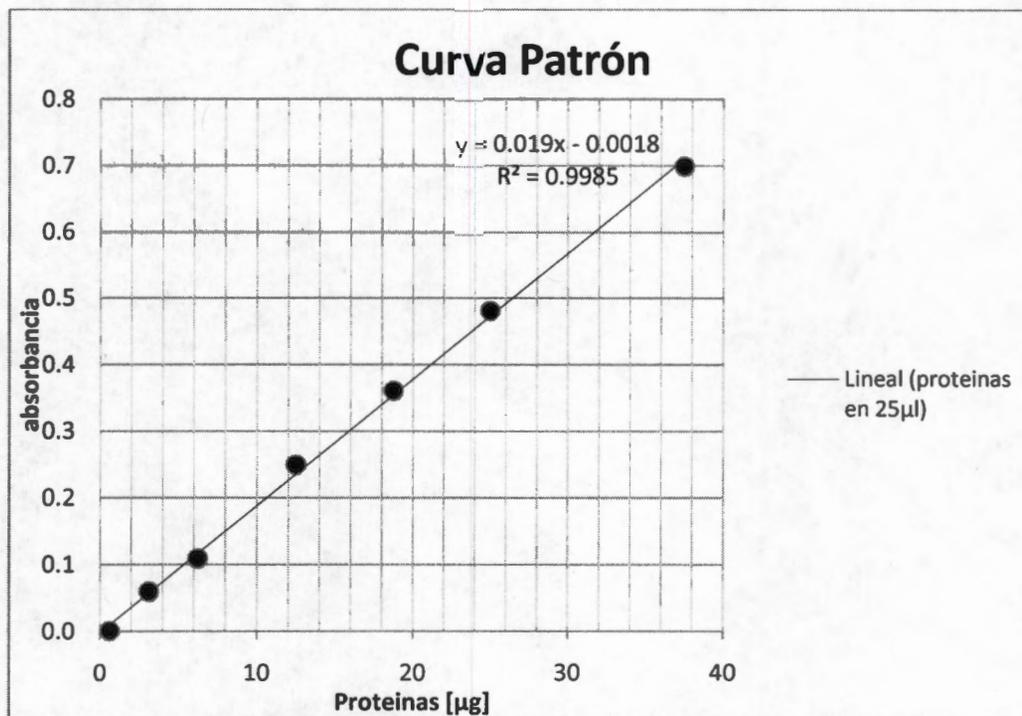
Tabla 3.1 Valores de absorbancias para la curva patrón

En la tabla 3.1 vemos los resultados de las absorbancias para los estándares cuyas letras están en la primer columna y sus valores de absorbancia se ven en la segunda columna, en la tercer columna vemos los valores anteriores solo que se les resta el valor del blanco, que en este caso es la absorbancia del agua destilada para tener únicamente los valores de proteínas requeridos.

En la cuarta columna podemos observar las concentraciones proteínicas que tienen los estándares, que sirven para realizar nuestra curva patrón al utilizar la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína en 25 } \mu\text{l} = 25(\text{concentración BSA})/1000$$

Ya que se trabaja con 25 µl de los estándares y de las muestras y el resultado es lo que se expresa en la quinta columna, para después graficar los puntos en dispersión y realizar una regresión lineal con lo que obtenemos una ecuación de una recta, con la que podemos interpolar los valores de absorbancias de nuestras muestras.



Grafica 3.1 Curva patrón con su respectiva ecuación que describe el comportamiento lineal de las concentraciones y permite realizar las interpolaciones pertinentes de las medidas obtenidas de cada muestra

Con las muestras tomadas del sobrenadante procedimos a cuantificar la proteína, para interpolar los valores obtenidos con la ecuación de la recta de la curva patrón con lo cual recabamos los siguientes datos:

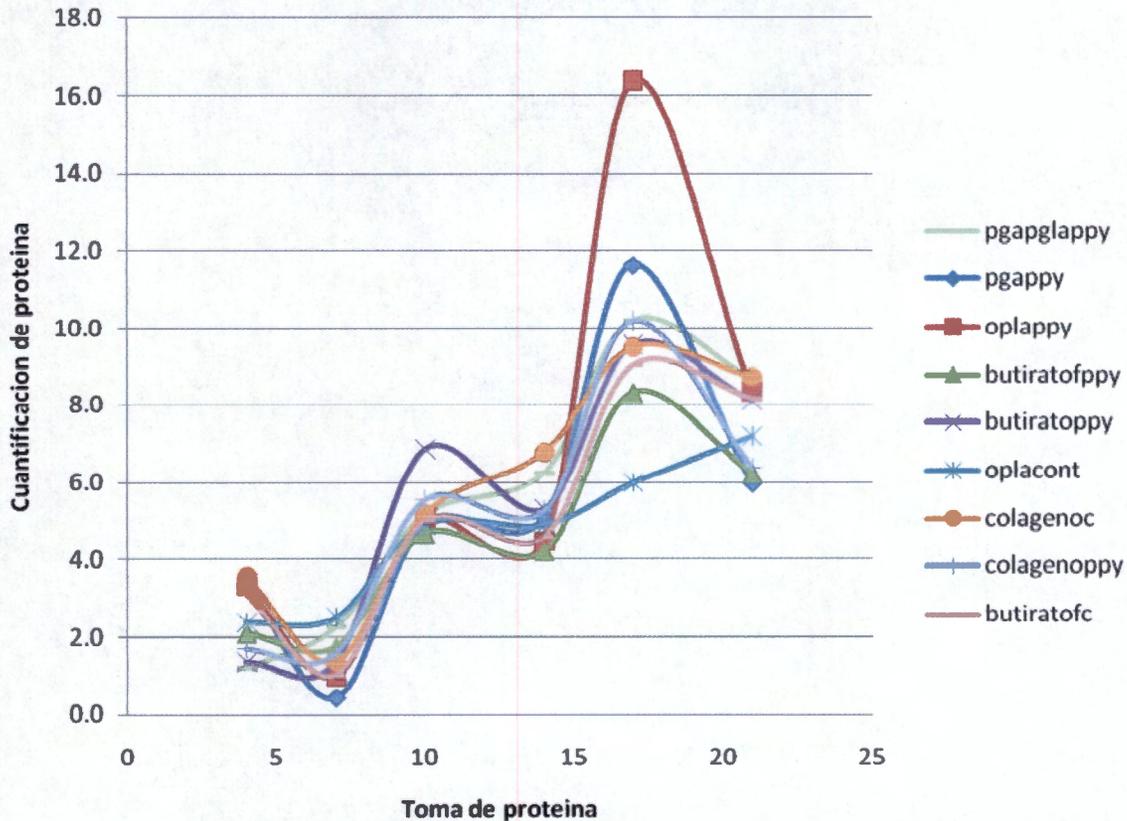
día	proteína contenida [µg en 25 ml]					
	día 4	día 7	día 10	día 14	día 17	día 21
pgapglappy	1.9	1.3	5.2	6.2	10.2	8.7
pgappy	3.4	0.4	4.9	5.1	11.6	6.0
oplappy	3.3	1.0	5.1	4.5	16.4	8.3
butiratofppy	2.1	1.8	4.7	4.2	8.3	6.2
butiratoppy	1.4	1.4	6.9	5.3	9.6	8.1
oplac	2.4	2.5	4.9	4.9	6.0	7.2
colagenoc	3.6	1.4	5.2	6.8	9.5	8.7
colagenoppy	1.7	1.6	5.5	5.3	10.2	6.4
butiratofc	3.1	1.0	5.0	4.6	9.0	8.1

Tabla 3.2 Proteínas contenida en 25 ml. del sobrenadante tomadas en los días de cultivo que se especifican en la primer fila

La nomenclatura utilizada fue la misma que el nombre de los materiales solo que a los materiales recubiertos con pirrol se les agrego la terminación "ppy" y a los materiales sin recubrimiento se les agrego una "C".

Para obtener la siguiente grafica donde se muestran los datos crudos:

Cuantificacion de proteina



Grafica 3.2 Proteínas del sobrenadante de cada andamio utilizado a lo largo del experimento con sus respectivos días de toma de las muestras

Esta información revela poca información debido a que se tomaban las muestras a diferentes días en referencia a los cambios de medio, por lo que se decidió cambiar la grafica de las proteínas, por una grafica de taza de producción de proteína, que se obtiene promediando los días que transcurrieron entre el cambio de medio y la toma de proteína a partir del calendario de días de cultivo que dibujamos en la siguiente tabla:

LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO	DOMINGO
				SEMBRADO	1	2
	4					
3	CAMBIO	5	6	7	CAMBIO	8
10		12		14		9
CAMBIO	11	CAMBIO	13	CAMBIO	15	16
17		19		21		
CAMBIO	18	CAMBIO	20	CAMBIO		
		Muestra				

Tabla 3.3 Calendario de Cultivo. De color azul se marcan los días en que se tomo la muestra del sobrenadante y con la palabra "CAMBIO" se resaltan los días en los que se cambio de medio de cultivo

En este calendario se muestran los días transcurridos durante las tres semanas que duro el experimento, y los días en que se hacia el cambio de medio celular indicados con la palabra "CAMBIO", además de mostrar los días en los que se realizo la toma de muestra del sobrenadante para realizar la medición de proteína indicados con los bloques pintados de color azul, tomando como día cero el día de sembrado de las células en nuestros materiales.

Por lo tanto, para realizar la tabla de la taza de producción de proteínas que se muestra en la tabla 3.4, se toman en cuenta los días completos que transcurrieron entre el día de cambio de medio y el día en que se toma la muestra para medir la cuantificación de proteína.

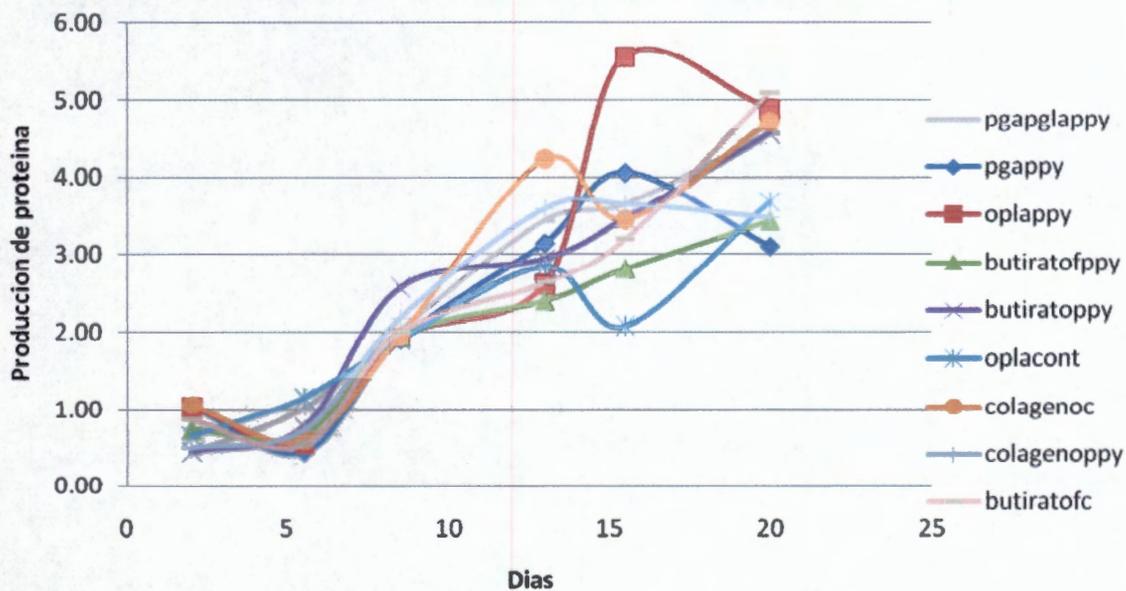
Con estos valores promediamos los días transcurridos para obtener el día que debemos poner los puntos de medición de la taza y sacamos a partir de estos incrementos de tiempo los valores de velocidad de producción de proteínas con lo que obtenemos la producción de proteína producida por el número de células que se tengan en el momento de realizar la medición, sin que interfieran los valores en que se realizo el cambio de medio y no se tomo muestra del sobrenadante en nuestros valores actuales.

Taza de proteínas [μg]	2	5.5	8.5	13	15.5	20
pgapglappy	0.43	1.01	2.02	3.43	3.65	4.57
pgappy	1.04	0.44	1.90	3.15	4.06	3.10
oplappy	1.02	0.54	1.92	2.60	5.56	4.88
butiratofppy	0.19	0.21	0.23	0.36	0.10	0.71
butiratoppy	0.74	0.67	1.94	2.40	2.81	3.43
oplac	0.21	0.08	0.38	0.30	0.04	0.32
colagenoc	0.45	0.78	2.57	2.94	3.46	4.56
colagenopp	0.11	0.32	0.28	0.28	0.27	0.51
y	0.64	1.14	1.89	2.84	2.07	3.67

Tabla 3. 4 Taza de producción de proteína donde se toman en cuenta los tiempos de cambio de medio y los días de toma de muestra del sobrenadante de los cultivos

En esta nueva tabla, al tener una taza de producción de proteínas podemos ver un crecimiento más uniforme debido a que tomamos las velocidades a las que las células vierten proteínas al medio de cultivo celular como se ve en la siguiente grafica.

Taza de producción de proteína



Grafica 3.3 Taza de producción de proteína, donde se muestran los valores de proteína celular a partir de los días de cambio de cultivo, en contraparte de la grafica 3.2 donde solo se consideraron los días de toma de muestra

Con estos datos corroboramos la funcionalidad de nuestras células ya que claramente se puede observar el aumento de la proteína vertida en el sobrenadante, además de que el aumento se produce también por el crecimiento exponencial del número de células dentro de las esponjas.

➤ **Presentación de los resultados finales del crecimiento volumétrico apoyado en imágenes de microscopia confocal**

Por último, la prueba morfológica se comprueba por medio del banco de fotos que fueron registradas cada tercer día, justo después de realizar el cambio de medio para tener un campo visual más nítido, las fotografías que se muestran fueron tomadas con el microscopio óptico a un aumento de 40x, mostrando únicamente las fotos más trascendentales del experimento.

El orden de las fotografías está acomodado de acuerdo a los resultados favorables, siendo los primeros casos donde la adherencia celular y la proliferación fueron más significativas y se muestra la técnica de tinción de Hoescht descrita anteriormente para resaltar el material y la localización de las células, en los materiales donde la proliferación fue abundante.

Acido Poliláctico

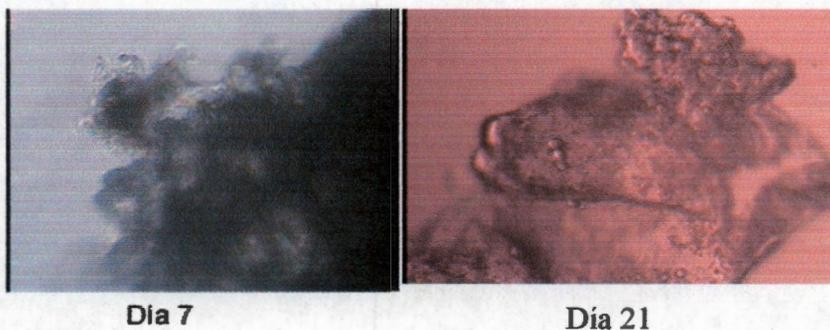


Figura 3.9 Esponjas de Acido Poliláctico a diferentes días de cultivo tomadas con un aumento de 40x

Al utilizar esponjas de ácido Poliláctico, los resultados fueron favorables, pero el problema surgió al momento de tomar las imágenes ya que son poco explícitas debido a que el tamaño de por es muy pequeño y solo se pueden tomar imágenes en las orillas del material es por eso que solo reportamos las imágenes más representativas de este material ya que las demás fotografías revelan poca información debido a que para obtener las imágenes de todos los materiales utilizamos técnicas bidimensionales siendo estas poco efectivas para este tipo de resultados tridimensionales debido a que las fotos deben mostrar diferentes campos visuales para obtener buenas imágenes tridimensionales, estos procesos se realizaron para los cuatro biomateriales con polipirrol que se muestran enseguida.

Ácido Poliláctico con polipirrol

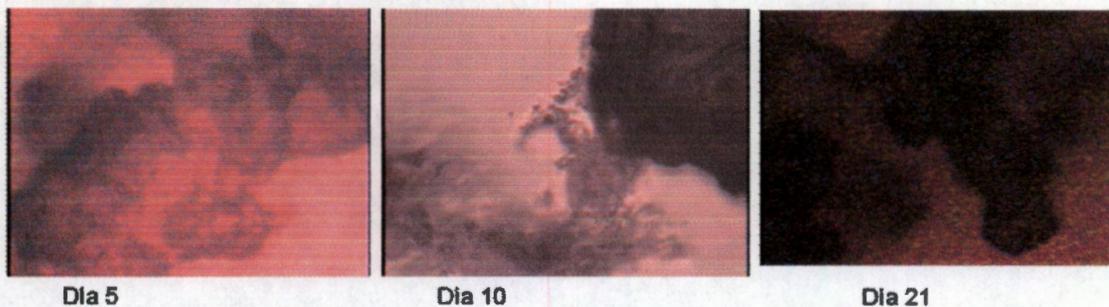


Figura 3.10 Esponjas de Ácido Poliláctico con polipirrol a diferentes días de cultivo

Para este biomaterial como habíamos descrito más arriba resultó bastante difícil obtener información del microscopio óptico pero los valores de cuantificación de proteína que reportamos después de las imágenes nos llevaron a realizarle el método de tinción de Hoescht, siendo las siguientes imágenes los resultados del día 22 de cultivo celular con tinción nuclear.

En la imagen 3.11 podemos observar tomas de la orilla del biomaterial siendo la imagen del biomaterial solo muy poca informativa, pero si miramos los núcleos teñidos podemos localizar las células a pesar de que no sea muy clara la imagen del material, y por último vemos la distribución de las mismas sobre el material recubierto, mostrando una buena proliferación y adherencia.

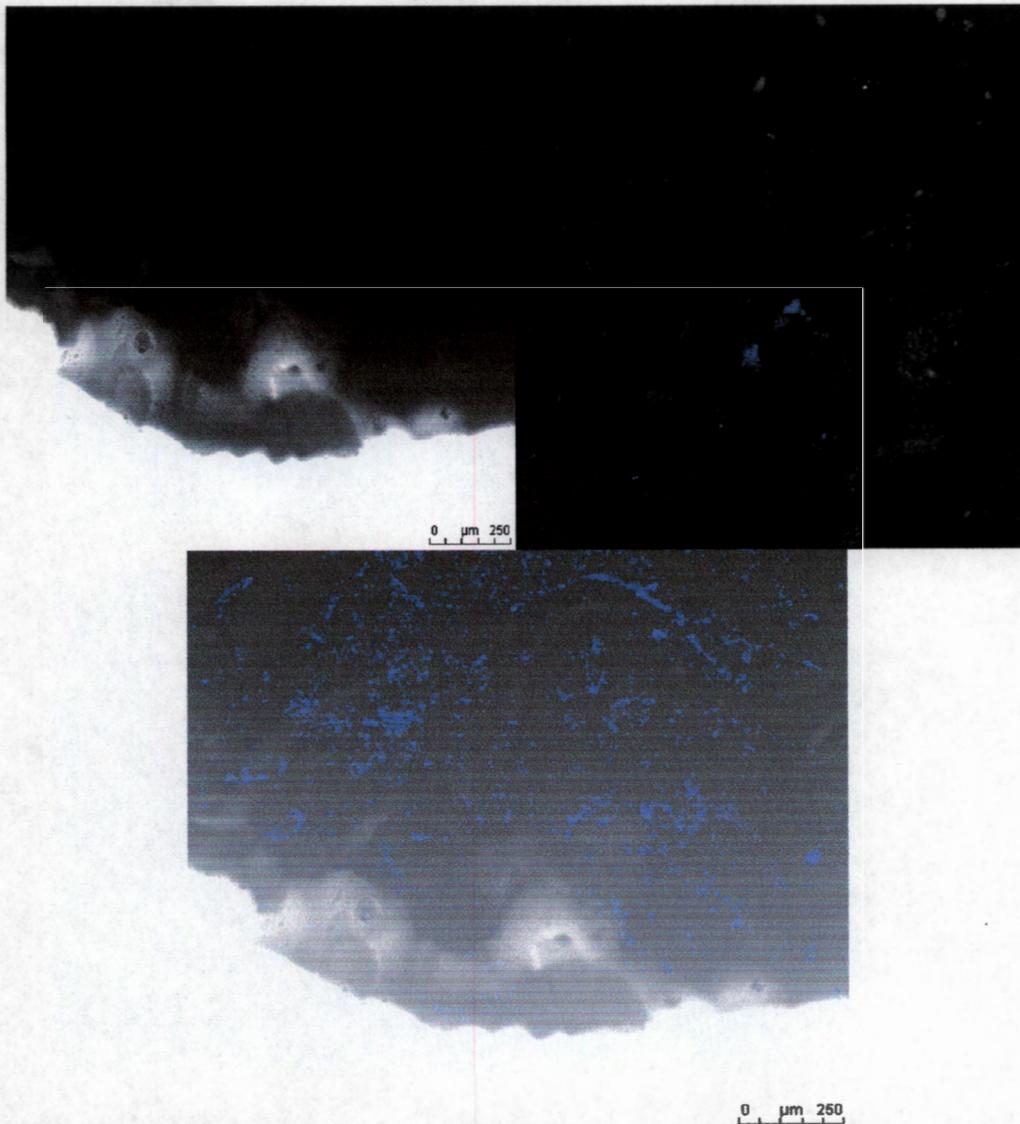
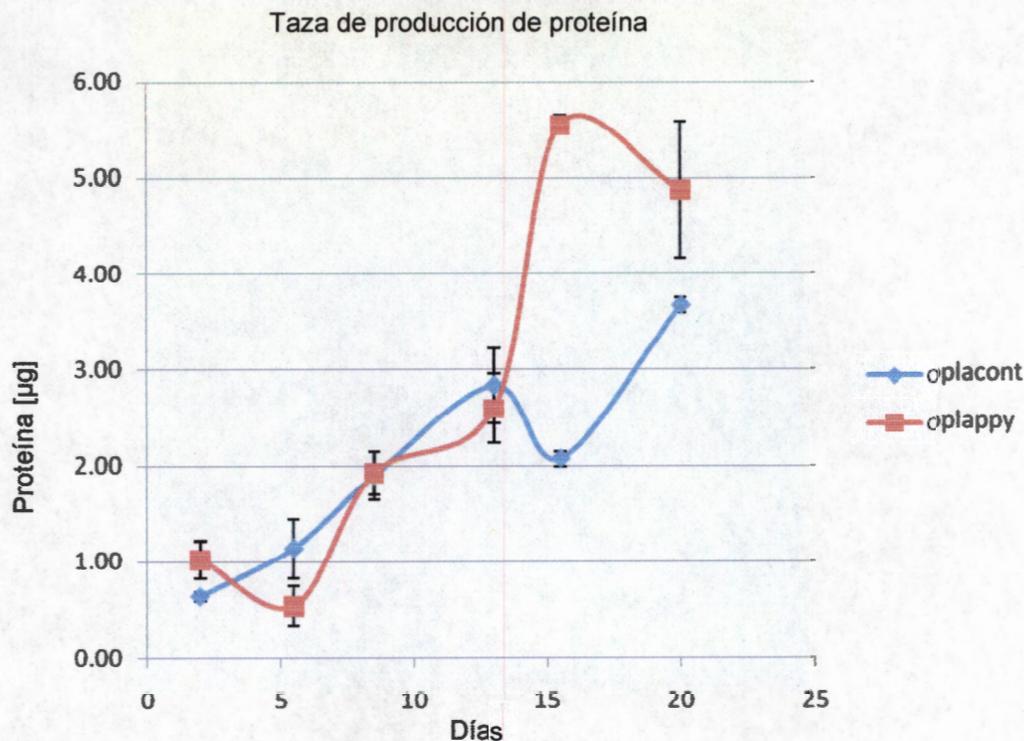


Figura 3.11 Tinción de Hoescht al día 21 de cultivo sobre las esponjas de Acido Poliláctico con polipirrol

El tamaño de poro del material es una parte fundamental en los buenos resultados obtenidos ya que permiten tener a poca distancia las células y brindarles protección del exterior.

La siguiente grafica nos muestra los valores de cuantificación de proteína para este material comparándolo con los resultados del material recubierto con polipirrol.



Grafica 3.4 Taza de producción de proteína de las esponjas de Acido Poliláctico con tratamiento superficial y control.

De acuerdo a los valores obtenidos podemos ver que la producción de proteína en el OPLA recubierto con polipirrol es significativa respecto a su control sin recubrir, por lo que podemos decir que el recubrimiento no interfiere en la producción proteica además de que para este material lo llega a potencializar ya que fue el que alcanzo el valor máximo de más de 5 microgramos de taza proteína cuantificada, podemos ver que las barras de error no se traslapan en los últimos dos valores, con lo que podemos inferir que están bien diferenciados los valores de un material y otro, además de contar con la intervención de las células que están ancladas al fondo de las cajas de cultivo, mismas que contribuyen a la producción final de proteínas.

Polivinil butirato poro abierto

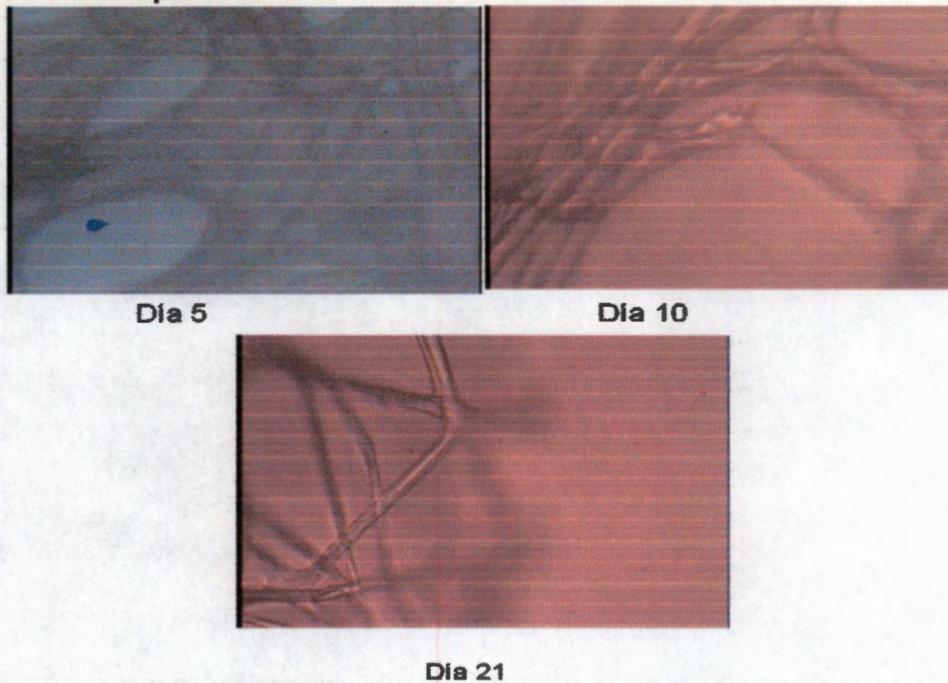


Figura 3.12 Esponjas de Polivinil butirato poro abierto a diferentes días de cultivo.

Con este biomaterial no se reportaron progresos durante los días de cultivo ya que nunca lograron adherirse al andamio estructural las células hepáticas de una forma significativa de tal forma que formaran racimos celulares, como se puede observar en la figura 3.12. Casi todas las células proliferaron en el sobrenadante y en el fondo del pozo de cultivo, por lo que no es un buen modelo de cultivo volumétrico.

Polivinil butirato poro abierto con polipirrol

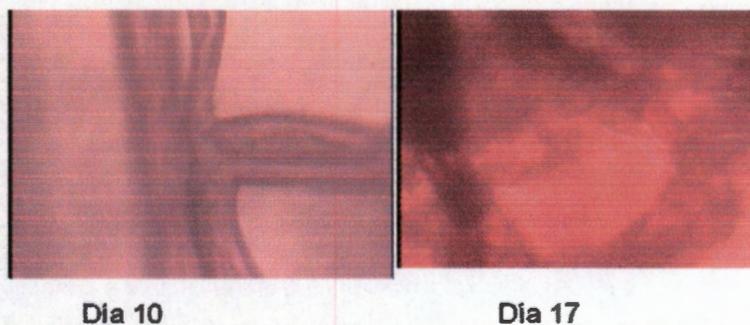


Figura 3.13 Esponjas de Polivinil butirato poro abierto con polipirrol a diferentes días de cultivo.

Este ultimo material no es biodegradable y hasta los primeros 10 días de cultivo no se podía observar un recubrimiento celular en las fibras el material como se muestra en la figura 3.13, por lo que pensamos que no obtendríamos resultados óptimos, pero a partir del día 12 se realizó una producción celular significativa misma que podemos observar en la foto del día 17 de cultivo y se decidió realizarle el tratamiento de tinción celular y usar microscopia confocal para observar los resultados que se reportan en la figura 3.14.

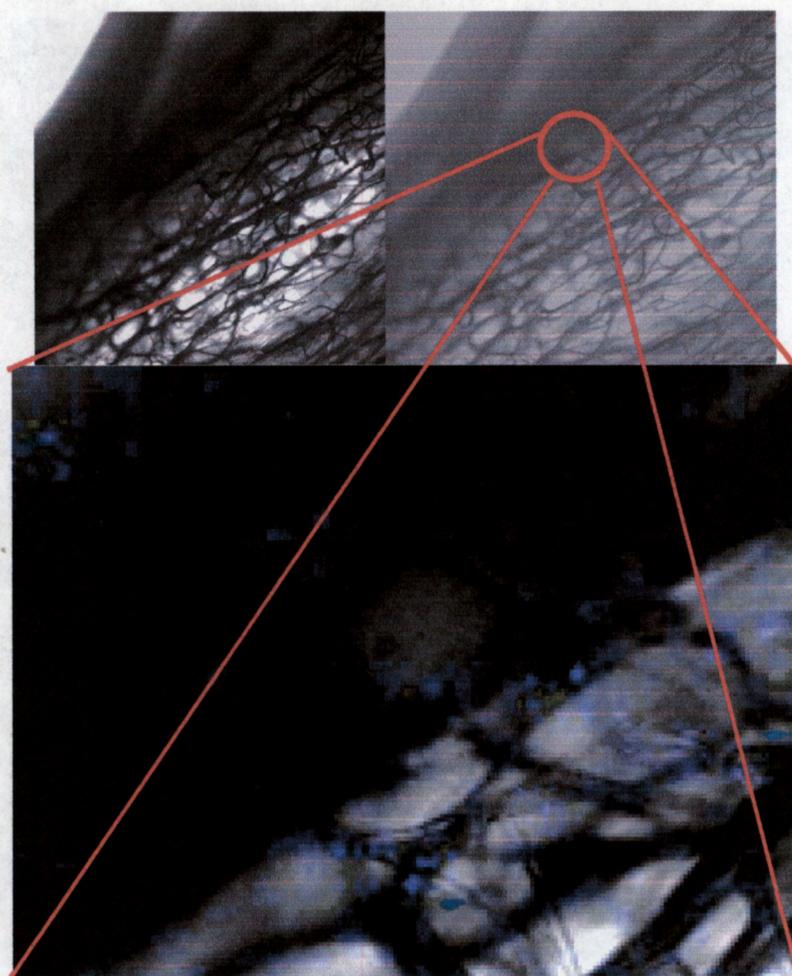
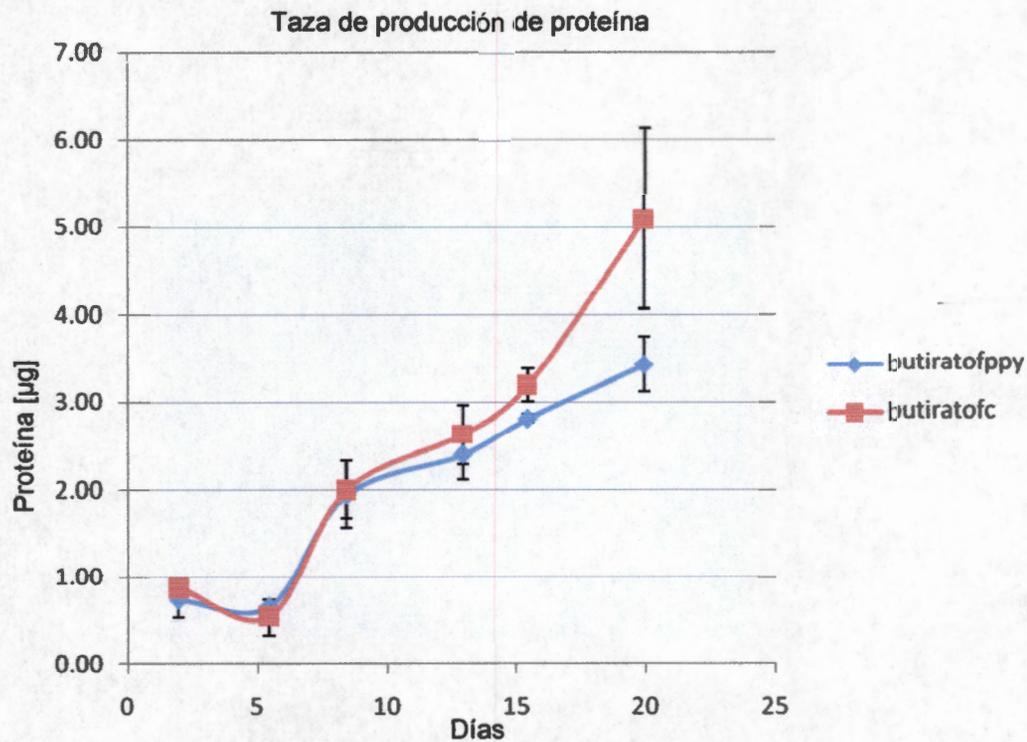


Figura 3.14 Tinción de Hoescht al día 21 de cultivo.

Al realizarles el tratamiento de la tinción de Hoescht parecería que se desprendieron todas las células del material a pesar del recubrimiento, pero al realizarles un acercamiento a las imágenes podemos ver que debido a la

interacción del material con las células parecería que se compactaron las células obteniendo la imagen ampliada donde podemos ver los núcleos celulares sobre las fibras del material.



Grafica 3.5 Taza de producción de proteína de las esponjas de Polivinil butirato con tratamiento superficial y control.

Para este material podemos ver que las diferencias respecto a la producción de proteína del material recubierto con el material control maneja una pequeña diferencia ya que el material control reporta en los últimos dos valores un valor promedio mayor de proteínas que su contraparte recubierta.

Colágeno

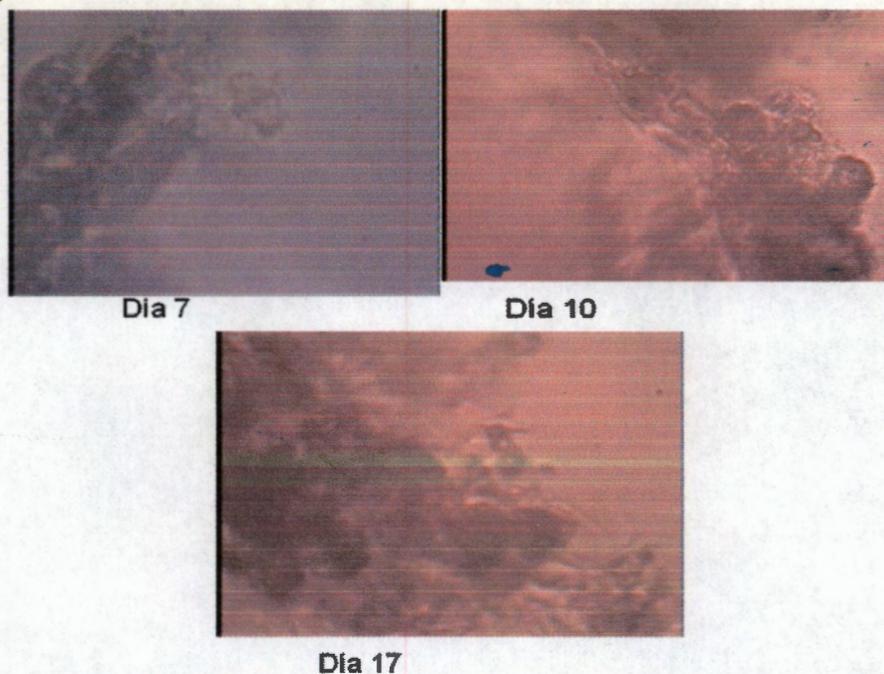


Figura 3.15 Esponjas de Colágeno a diferentes días de cultivo.

En las imágenes de este tipo de andamios ya podemos observar una proliferación y adherencia celular bastante buena ya que soportaron hasta el último día de cultivo las células proliferando sobre el material, las imágenes de la figura 3.15 muestran los progresos de la proliferación celular, siendo las células las partes que se ven grumosas dentro de las imágenes, reflejándose además los resultados positivos en la tasa de producción de proteína.

Colágeno con polipirrol



Figura 3.16 Esponjas de colágeno con polipirrol a diferentes días de cultivo.

Con el colágeno recubierto de pirrol podemos ver unos resultados óptimos con el microscopio de campo abierto, tanto en proliferación como en adherencia y en cuanto a las producción de proteína por lo que se decidió teñir sus núcleos y tener los siguientes resultados, donde conjuntamos las imágenes del material con los núcleos celulares de color azul para facilitar observar su localización dentro del material.

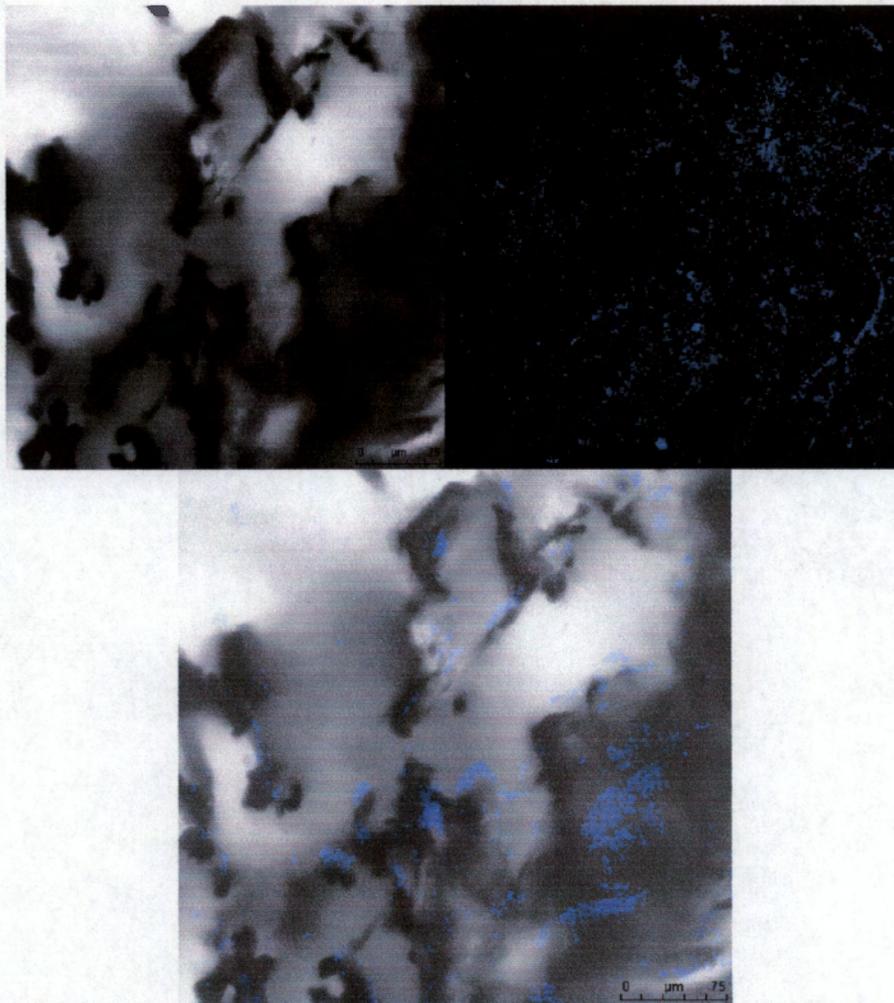
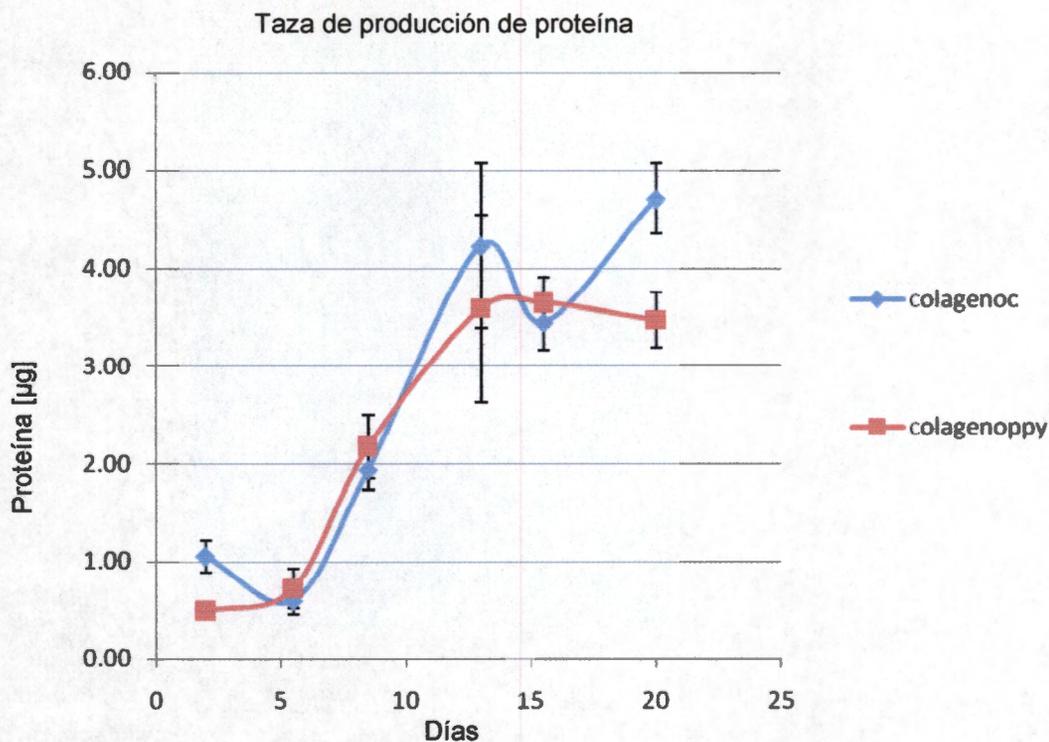


Figura 3.17 Método de Tinción de Hoescht aplicado al día 21 de cultivo.

En estas imágenes podemos observar el material visto en diferentes planos con las células, la ubicación de los núcleos celulares en tonos azules y por último la superposición de las imágenes para tener una imagen con la que podemos

demostrar resultados óptimos del material y la fuerte adherencia de las células ya que para realizar la tinción de Hoescht se realizan procedimientos muy bruscos como están reportados en el capítulo anterior los pasos para realizar dicha técnica.



Grafica 3.6 Taza de producción de proteína de las esponjas de Colágeno compuesto con tratamiento superficial y control.

Para este material tampoco se puede apreciar una diferencia en cuanto a la producción de proteína entre el material recubierto y el material control, por lo que podemos decir que en estos materiales la presencia del polipirrol no afecta la producción proteínica de las células en los cultivos celulares, ya que las células que no se encuentran adheridas al andamio siguen produciendo proteínas, ya sea que se localicen en el fondo de la caja de cultivo o permanezcan en suspensión en el medio de cultivo.

Los siguientes tres materiales utilizados, sirvieron para compararlos entre ellos mismos ya que están recubiertos con polipirrol y solo vamos a discutir las diferencias que pudieran mostrar en términos de adherencia celular y producción de proteína, para obtener un buen modelo.

PGA con polipirrol

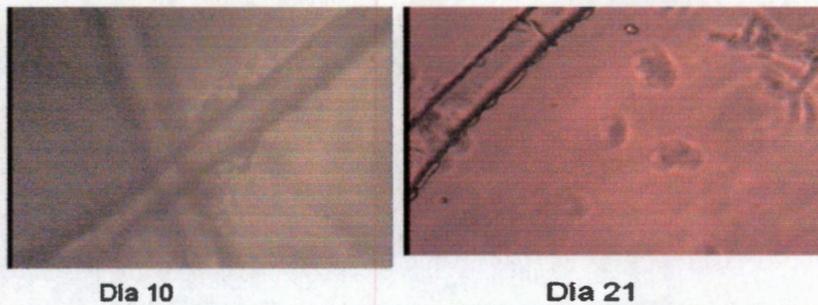


Figura 3.18 Esponjas de PGA con polipirrol a diferentes días de cultivo.

Como podemos ver en estas imágenes, la proliferación y adhesión celular al biomaterial, fue despreciable, a pesar de tener el recubrimiento del polipirrol, teniendo el mismo problema de los materiales anteriores, sin obtener resultados satisfactorios respecto a la proliferación celular sobre las fibras para obtener un cultivo tridimensional, ya que en este material si podemos apreciar cómo están proliferando las células hepáticas en el fondo de la caja de cultivo.

PGA-PGLA con polipirrol



Figura 3.19 Esponjas de PGA-PGLA con polipirrol a diferentes días de cultivo.

Con este biomaterial se obtuvieron los mejores resultados morfológicos de proliferación y adherencia, como se pueden mostrar en las imágenes obtenidas

con el microscopio óptico de la figura 3.19, por lo que se decidió corroborar los resultados y mostrar imágenes más explícitas de los que estaba ocurriendo dentro del biomaterial tratado superficialmente con polipirrol, como se muestra en las siguientes imágenes de microscopia confocal y de inmunofluorescencia que se muestran a continuación.

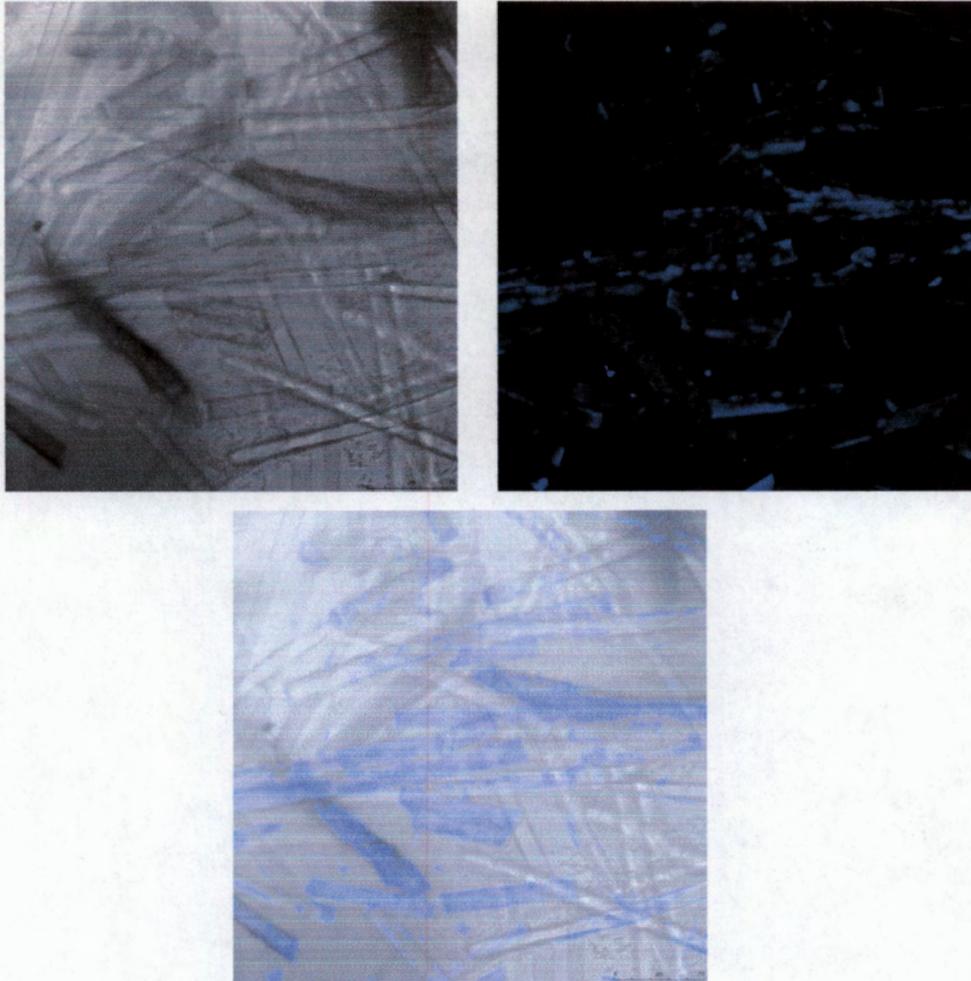


Figura 3.20 Tinción de Hoescht al día 21 de cultivo.

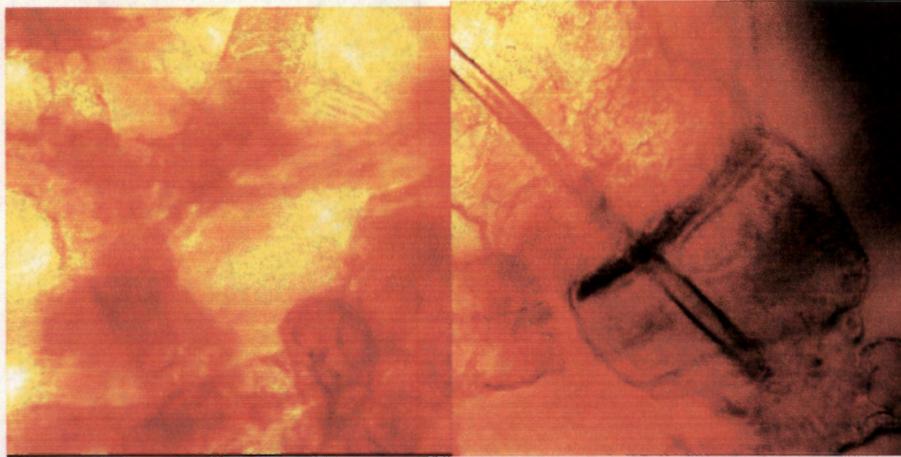


Figura 3.21 Microscopia confocal con ampliificaciones de 10X y 40X del material recubierto con polipirrol PGA-PGLA

Este material fue el que se degrada más rápidamente, es por eso que las últimas imágenes se muestran las fibras como si estuvieran cortadas, pero solo es el efecto de la degradación, aprovechando esto y que las imágenes permitían darle más detalles a cada fibra, por lo que se tomaron imágenes del material con el microscopio confocal a los aumentos de 10X y 40X donde reportamos una sola fibra recubierta con células, estas imágenes fueron tratadas electrónicamente para ver más claros los resultados.

Polivinil Butirato de poro cerrado



Día 5



Día 10

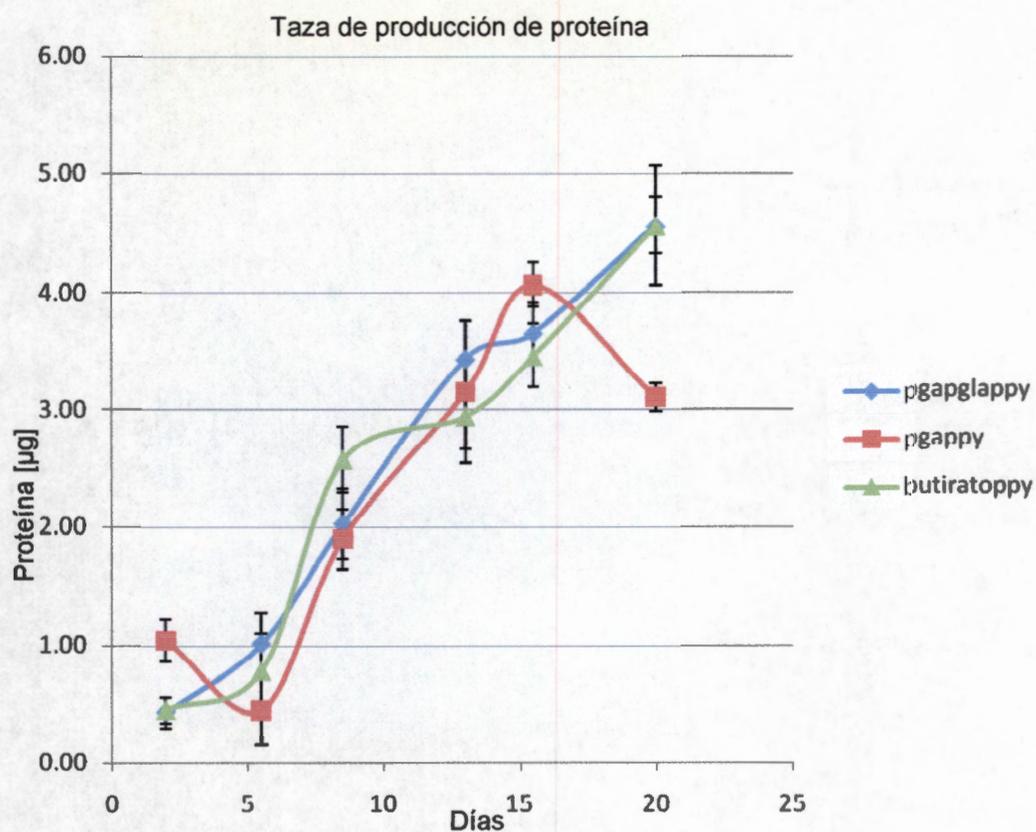
Figura 3.22a Esponjas de Polivinil butirato poro cerrado con pirrol a diferentes días de cultivo.



Día 17

Figura 3.22b Esponjas de Polivinil butirato poro cerrado con pirrol a diferentes días de cultivo.

En la figura 3.22^a y 3.22b podemos ver que los primeros días de cultivo utilizando este material, se genera una proliferación celular aceptable, pero conforme van pasando los días como se ve en la imagen del día 10, no logran tener una adherencia importante las células por lo que aunque exista proliferación celular, con cualquier esfuerzo mecánico, se desprenden las células y en los últimos días de cultivo vemos que el recubrimiento es mínimo e inestable ya que con cualquier agitación o esfuerzo mecánico, que se puede generar tan solo con mirarlas al microscopio para monitorear su progreso o para realizarles el cambio de medio, se desprenden las células y continúan proliferándose en el fondo del pozo de cultivo sin que estén pegadas al material que es lo que finalmente queremos.



Grafica 3.7 Taza de producción de proteína de las esponjas de PGA, PGA-PGLA y Polivinil butirato con tratamiento superficial

En la grafica de taza de producción de proteínas de los tres materiales recubiertos con polipirrol, podemos comparar que no existe una diferencia notable entre un material y otro ya que los valores son muy similares unos con otros, y que las barras de error incrementan conforme se van tomando valores de mayor magnitud conforme van transcurriendo los días de cultivo, y que están dentro del rango de los valores característicos que podemos observar en la grafica de taza de proteínas, donde superponemos todos los materiales, por lo que para seleccionar uno de estos andamios para realizar un cultivo celular, debemos basarnos en las imágenes reportadas anteriormente.

Capítulo 4. Discusión

Para poder llevar a cabo este trabajo fue necesario comprender las técnicas de cultivo celular y tinción en dos dimensiones para después desarrollar e implementar nuestras propias técnicas para trabajar en tres dimensiones, ya que lo que se reporta en la literatura sobre trabajos similares son únicamente los resultados pero toda la técnica implícita se maneja muy someramente, además de contar con muy pocas referencias literarias sobre cultivos tridimensionales.

El primer obstáculo al que nos enfrentamos con este tipo de cultivos, es la toma de imágenes y fotografías para monitorear los progresos; ya que los microscopios invertidos de campo claro únicamente permiten enfocar un solo plano de las imágenes por lo que debimos tomar nuestras imágenes en los bordes del material para diferenciar muy bien las estructuras de andamiaje de las células que estuvieran creciendo en las orillas del material.

Para lograr esto debimos de familiarizarnos con las formas y cúmulos que forman las células cultivadas en monocapa vistas al microscopio y nuestros materiales sin células sembradas, para poder ver la conjunción de ambos casos.

Respecto a los cultivos volumétricos la principal diferencia con el cultivo tradicional, fue que la proliferación celular en tres dimensiones se ve reducida debido a que la reproducción celular se lleva a cabo por partenogénesis y solo pueden estar creciendo una junto a otra sobre la superficie en que fueron sembradas y en los materiales utilizados en este trabajo al estar compuestos de fibras, necesita ser muy exacta la localización de la nueva célula para que corresponda con el material y se adhiera, ya que en caso contrario la célula simplemente se desprende y cae al fondo de la caja de cultivo.

Una conclusión importante que obtenemos del párrafo anterior, es que el tamaño de poro de los materiales es fundamental para realizar un crecimiento volumétrico ya que al estar más cercanas las células pueden formarse racimos de las mismas y alcanzar la siguiente fibra para rellenar los huecos del material, como se pueden ver en las estructuras de PGA-PGLA.

Como pudimos ver en las fotos, los materiales que adhieren mejor a las células son los materiales que contienen Acido Poliláctico o sus derivados, esto debido a que el acido Poliláctico es recibido y sintetizado dentro del cuerpo humano, únicamente por el hígado debido a que tiene una forma específica que se ancla únicamente a los hepatocitos, por lo tanto si lo utilizamos como andamio podemos inferir que está sucediendo el mismo fenómeno a la inversa para obtener muy buenos resultados.

Además si dichos materiales los recubrimos por medio de plasma con polipirrol, podemos aumentar el periodo de degradación, ya que en las fotos del PGA-PGLA recubierto de polipirrol se observan cortadas las fibras debido a que comenzaba a degradarse el material, y como vemos en las graficas de producción de proteína no influye el polímero superficial en cuanto a la producción de proteínas ni en la adherencia además de ser biocompatible.

Por ser una capa muy delgada de polímero y no modificar las propiedades superficiales de los materiales implicados en la adherencia celular, podemos ver que una vez que se degrado el material usado como andamio, quedaría únicamente el esqueleto formado por el polipirrol para darle estructura a las células además de que podemos utilizar dichos canales para vascularizar el tejido tridimensional.

La intervención del polímero en los biomateriales sirve para darle un poco mas de adherencia a las superficies de los mismos, sin intervenir en su producción de proteína por lo tanto podemos deducir que si recubrimos materiales que

contengan ácido Poliláctico y que sean de poro cerrado obtendremos los mejores resultados en cuanto a morfología y adherencia celular así como en la producción de proteínas, mismas que podemos potenciar si agregamos algunos compuestos al medio de cultivo tales como la nicotinamida o la insulina.

Por otro lado como mencionamos más arriba, la técnica de tinción de organelos celulares está establecida para dos dimensiones ya que una vez que teñiste los organelos, procedes a fijarlas en portaobjetos y trabajar con ellas las veces que desees, con lo que deducimos que podíamos emplear la técnica de tinción de Hoescht en nuestro andamio tridimensional recubierto de células sin fijarlas a portaobjetos y desarrollamos nuestro protocolo de tinción celular en tres dimensiones.

Una vez teñido el material y las células se decidió utilizar microscopia confocal para generar una imagen donde estuvieran enfocados varios planos al mismo tiempo y con esto obtener una imagen detallada de las células y el material con un campo amplio de visión, además de superponerle la imagen de las células teñidas de azul para ver su distribución.

Por último, para la parte de producción de proteínas podemos observar que los valores de proteína producidas por las células varían dependiendo del tipo de material utilizado, y que se mantienen todos los materiales en un rango razonable, a pesar de que no se localicen demasiadas células dentro del andamio debido a que están creciendo en el fondo de la caja de cultivo salvo la excepción del OPLA recubierto con polipirrol, donde reportamos un aumento considerable de proteínas respecto a su control y los demás materiales utilizados.

Esto es debido a que se adhirieron muy bien al material y su proliferación fue notable gracias al ácido Poliláctico, ya que podemos ver los resultados en las fotografías y las graficas de la tasa de producción de proteína, por lo que este

material es el modelo que caracteriza este trabajo en su totalidad ya que es el que funciona mejor tanto en proliferación celular como en la producción de proteínas.

Con las imágenes combinadas obtuvimos el modelo preciso del crecimiento volumétrico de hepatocitos en 3D y con la tasa de producción de proteínas medimos la producción proteica de los cultivos celulares, por lo que concluimos que fue un éxito el experimento, por lo que para futuras mejoras de este trabajo podemos decir que se deben utilizar andamios de ácido Poliláctico recubiertos con polipirrol ya que fueron donde se obtuvieron los mejores resultados tanto morfológicamente como de producción de proteína, además de que podemos extender el tiempo de cultivo, para observar lo que sucede cuando se suscita la degradación total del material y obtener un recubrimiento celular más significativo.

Además de que podríamos medir la producción de proteínas específicas del hígado, excretadas al sobrenadante, por medio de pruebas de ELISA o western blot, ya que con este tipo de pruebas obtenemos la cantidad específica de las proteínas que buscamos en el orden de los picogramos ya que utiliza marcadores que reaccionan ante las proteínas deseadas para efectuar su medición; cabe aclarar que en este experimento no se realizaron ese tipo de pruebas debido a su alto grado de complejidad de elaboración, sin contar lo difícil que resulta conseguir los anticuerpos específicos para cada proteína que pretendemos rastrear en el sobrenadante.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo logramos desarrollar un modelo de crecimiento hepático en tres dimensiones utilizando andamios de biopolímeros modificados superficialmente mediante la polimerización por plasma.

Para llevar a cabo este trabajo fue necesario establecer las condiciones de polimerización por plasma óptimas para recubrir los andamios, utilizando como referencia el trabajo realizado por los asesores anteriormente dentro de la UAM- I, utilizando los siguientes rangos de valores de presión, potencia y tiempo:

- De 3 a 6 X 10⁻³ Bar.
- De 20 a 50 watts.
- De 50 a 90 minutos.

Se estudio la técnica de cultivo celular de hepatocitos en dos dimensiones para después modelar esta técnica en tres dimensiones sobre los andamios recubiertos con polipirrol descritos anteriormente y lograr su proliferación.

Para realizar las pruebas fisiológicas se tomaron muestras del sobrenadante del cultivo dos veces por semana, con lo que se comprobó la producción proteínica de las células al estar proliferándolas en tres dimensiones y que no interfiriera la presencia del pirrol en sus funciones metabólicas.

Por último se tomaron las fotografías finales utilizando la microscopia confocal para obtener una imagen con varios planos enfocados teniendo como referencia los núcleos celulares iluminados por medio de la técnica de tinción de Hoescht para demostrar el crecimiento tridimensional de las células sobre los andamios modificados estructuralmente.

Referencias

[1] González Soto E. Bucio Ortiz L. Damián Matsumura P, "Manual de Bioquímica 1", Ed. AGT. (pags. 20-40, 60-86).

[2] Goldsby R., Kindt T. Kuby J. "Inmunología", Ed. Mc Graw hill (pags. 40-70).

[3] La ingeniería de tejidos, consultado en diciembre de 2008 en http://www.smartplanet.es/articulos.php?pageNum_ctapag=1&totalRows_ctapag=6&id=9-4-5

[4]Departamento de inmunología IPN-ENBC, "Manual del curso teórico-práctico de inmunología" Ed. SEP 2001 (pags. 16-38, 46-66).

[5] BIEDERMAN, H., SLAVINSKA, D., "Plasma polymer films and their future prospects" Surf. Coat. Tech. 125: (1-3) 371-376 Mar 2000

[6] Vacanti, C.A., Vacanti, J.P., Langer, R., "Tissue Engineering Using Syntetic Biodegradable Polymers, Polymers of Biological and Biomedical Significance Chapter 2", Shalaby, W.S., Ikada, Y., Langer, R., Williams, J. Editors, American Chemical Society, Washington, D.C., 1994.

[7] Jaramillo E., "Obtención de una Película Polimérica por Medio de un Reactor Plásmico Prototipo y Caracterización Físico-química de Dicha Película", Proyecto de Grado, UIS, Bucaramanga, 1.991

[8] Patrick, Ch. W., del Anderson "Cancer Center de la Universidad de Texas, OncoLog", mayo 2005, Vol. 50, No. 5, consulta en Internet, enero 2009: <http://www2.mdanderson.org/depts/oncolog/sp/articles/05/5-may/5-05-1.html>
¹ Yasuda, H., Plasma Polymerization, Academic Press, 1985.

[9] Transplantes en México, consultado en enero de 2009 en www.invdes.com.mx/antiores/Agosto1999/htm/trans75.html

[10] Periodismo de Ciencia y Tecnología. Consultado en enero de 2009 en www.invdes.com.mx/antiores/Junio2000/htm/issste85.html

[11] Navarro Adriana. *El trasplante de Hígado en Jalisco, Un milagro de vida a pesar de la burocracia institucional.* magazinemx.com

[12] Thomas RJ, Bennett A1, Thomson B2, and Shakesheff KM. "Hepatic stellate cells on poly(DL- lactic acid) surfaces control the formation of 3D hepatocytes co-culture aggregates in vitro" *European cells and Materials* Vol. 11. 2006 (pags 16-26)

[13] Simon C. Baker, Geraldine Rohman, Jennifer Southgate, Neil R. Cameron. "The relationship between the mechanical properties and cell behavior on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering". *Biomaterials* 30 (2009) 1321-1328

[14]] E. Pérez-Tejada, J. Morales, L.E. Gómez-Quiróz, M.G. Olayo, G.J. Cruz, M.C. Gutiérrez-Ruiz , R. Olayo, "Pruebas de toxicidad usando hepatocitos humanos sobre diferentes polímeros sintetizados por plasma", XX Congreso Nacional SPM, 2007.

[15] Valerie Liu Tsang, Alice A. Chen, Lisa M. Cho, Kyle D. Jadin, Robert L. Sah, Solitaire DeLong, Jennifer L. West, and Sangeeta N. Bhatia, "Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels", *The FASEB Journal • Research Communication* marzo 2007

[16] Radeva, E. I., Avramov, I. D., "High-resolution humidity measurements with surface transverse wave based in resonant devices. Applications to wireless remote sensing", *Mat. Sci. Eng. CBio. S 12: (1-2) 71-76 Sp. Iss. SI Aug. 18 2000.*

[17] CHAPMAN, Brian, "Glow Discharge Processes", John Wiley and Sons, New York, 1.980, Chap. 7

[18] ZHAO, J. G, YASUDA, H. K., "Effect of magnetic field configuration in the cathodic polymerization systems with two anode magnetrons", *J. Vac. Sci. Technol. A 18: (5) 2062-2066 Sep-Oct 2000*

[19] YASUDA, Hirotosugu, *Plasma Polymerization*, New York, Academic Press, 1.985

[20] S. Durrant, E. Rangel, M.A. Bica de Moraes, "International Conference on PlasmaPhysics", 1994

[21] Lynch, J., Raphael, S., Mellor, D., Spare, P. y Inwod, M. 1977. "Métodos de laboratorio. Nueva Editorial Interamericana". México. Capítulo 46. pg. 1300-1309.

[22] Guzmán, M., 1989. "Inmunofluorescencia : Fundamentos". INAS. Serie de notas e informes técnicos # 1.

[23] Abul, K. 1995. "Inmunología celular y molecular". Mc-Graw Hill. Madrid-España. Capítulo 5. (pags. 99-101).

[24] Rojas, W. 1995. "Inmunología. Corporación para Investigaciones Biológicas". Medellín, Colombia. Capítulo 14. (pags. 197-200).

[25] Murray, P., Drew, W., Kobayashi, G. y Thompson, J. 1992. "Microbiología Médica". Mosby Company. Madrid, España. Capítulo 39. (pags. 479- 482).

[26] Cruz G.J., Morales J., Olayo R., "Films obtained by plasma polymerization of Pyrrole", *Thin Solid Films* 342 (1999) (pags. 119-126)