



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**Modelo de cocultivos celulares hepáticos 3D
dentro de un biorreactor de flujo radial sobre
biomateriales modificados por plasma**

M. en C. Ramírez Fernández Juan Odin

DOCTORADO EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA BIOMÉDICA

Asesores:

Dr. Roberto Olayo González

Dr. Rafael Godínez Fernández

Abril de 2015



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**Modelo de cocultivos celulares hepáticos 3D
dentro de un biorreactor de flujo radial sobre
biomateriales modificados por plasma**

M. en C. Ramírez Fernández Juan Odín

DOCTORADO EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA BIOMÉDICA

Asesores:

Dr. Roberto Olayo González

Dr. Rafael Godínez Fernández

Sinodales:

Presidente

Dr. Roberto Olayo González

Secretario

Dra. Leticia Bucio Ortiz

Vocal

Dra. María Cristina Velasquillo Martínez

Vocal

Dra. Claudia Mendoza Barrera

Vocal

Dra. Esperanza Gabriela Gutierrez Reyes

Índice

Resumen	3
Introducción	4
Estado del Arte	12
Hipótesis	29
• Objetivo General	29
• Objetivos Particulares	29
Materiales y Métodos	30
• Cultivos Celulares	30
• Superficies de Sembrado	30
• Polimerización por Plasma	31
• Infrarrojo por transformada rápida de Fourier (FT-IR)	31
• Diseño del Biorreactor	31
• Maquinado de Piezas	32
• Diseño Experimental	33
• Inmunocitoquímica	35
• Pruebas Fisiológicas	36
• Cuantificación de Proteínas	36
• Análisis de datos	37
Resultados y Discusión	38
• Análisis del espectro de FT-IR	38
• Pruebas de Medio de Cultivo	38
• Células HepG2 en cubreobjetos con Ppy-I y medio combinado	40
• Células HepG2 en PLLA con Ppy-I y medio combinado	41
• Experimentos células HUVEC	43
• Células HUVEC en cubreobjetos con Ppy-I y medio combinado	44
• Células HUVEC en PLLA con Ppy-I y medio combinado	45
• Cocultivo	47
• Diseño del biorreactor	49
• Cocultivo de células HUVEC con HepG2 en biorreactor y andamio con Ppy-I	54
Conclusiones y perspectivas	59
Bibliografía	61
Apéndice A. Cuaderno de trabajo	65

Resumen

Actualmente, el trasplante hepático representa la única opción terapéutica capaz de salvar la vida en los pacientes con una falla hepática aguda, y en los pacientes en estado crítico, donde se han agotado otras opciones terapéuticas. El hígado bioartificial es una opción de tratamiento en personas con daño hepático, se basa en la función hepática de los hepatocitos cultivados en un biorreactor, para obtener una terapia temporal eficaz para tratar un daño hepático agudo. En este trabajo se reporta la evaluación de un cocultivo celular hepático sobre un biomaterial polimérico, que ha sido modificado en su superficie con polipirrol sintetizado por plasma, sobre el cual se siembran células hepáticas no parenquimales y hepatocitos dentro de un biorreactor de flujo radial. Se presentan los resultados de los cultivos y cocultivos celulares, sembrados sobre este tipo de biomateriales con y sin polipirrol en su superficie, aplicando diferentes cinéticas de flujo en el biorreactor. Se diseñó una cámara de cultivo, donde las células son constantemente irrigadas por el medio de cultivo de forma radial. Una vez diseñado el sistema, el flujo fue simulado mediante un software de dinámica de fluidos computacional (Solidworks) que utiliza métodos numéricos para resolver las ecuaciones de flujo de Navier-Stokes. Se simuló la perfusión dentro de los andamios celulares a una velocidad de flujo de 7 ml/min. Se construyó el sistema de perfusión con piezas de acero de grado alimenticio y cristal pyrex. Los materiales empleados para los andamios, se seleccionaron en base a su biocompatibilidad y biodegradabilidad y que tuvieran además una estructura esponjosa para facilitar la proliferación de los hepatocitos, se eligieron andamios de ácido poliláctico (PLLA), ya que presentan las características mencionadas. Se cultivaron hepatocitos de la línea celular HepG2 sobre andamios de ácido L-poliláctico (PLLA) modificados en su superficie con polipirrol dopado con yodo (Ppy-I) y células endoteliales HUVEC, estos resultados se compararon con los datos de los cultivos únicamente con células HepG2 y con los andamios sin recubrir. 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. Se monitoreó la morfología y proliferación mediante el uso de microscopía de amplio espectro para corroborar la proliferación celular sobre el material tomando imágenes de los materiales con las células tres veces por semana. Se emplearon técnicas de inmunofluorescencia, que permiten teñir ciertos organelos celulares o proteínas de interés, se utilizó el marcador de Hoetscht, para diferenciar los núcleos de ambos tipos celulares, y el marcador del factor de coagulación VIII para localizar únicamente las células HUVEC. Con ayuda de la microscopía confocal, se obtuvieron imágenes con varios focos de profundidad, para ver la distribución celular en el interior del andamio, y poder discernir el material y las células teñidas para realizar una superposición de ambas imágenes. Realizando la técnica cromatográfica en el sobrenadante de cultivo, se midió de manera indirecta la cantidad de proteínas totales y específicas, que secretan las células HepG2. Finalmente, se construyó un biorreactor de flujo radial que permite realizar cocultivos celulares tridimensionales más eficientes, sobre andamios modificados en su superficie, obteniendo una mejor proliferación celular y una mejor producción de proteínas hepáticas entre las que destaca específicamente una mejor secreción de albumina. De estos estudios se concluye que obtuvimos un modelo de cocultivo celular en un andamio recubierto con Ppy-I, que puede ser utilizado en biorreactores de flujo radial para incrementar las propiedades fisiológicas de los hepatocitos.

Introducción

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo humano, que pesa aproximadamente el 2% del peso corporal en una persona adulta sana, dentro de él se llevan a cabo las principales actividades metabólicas necesarias para el organismo y de síntesis de proteínas como la albumina (principal transportador de nutrientes y lípidos dentro de la circulación sanguínea [1]), además de ser un reservorio sanguíneo y de nutrientes [2], se muestra un esquema del hígado en la Figura 1.

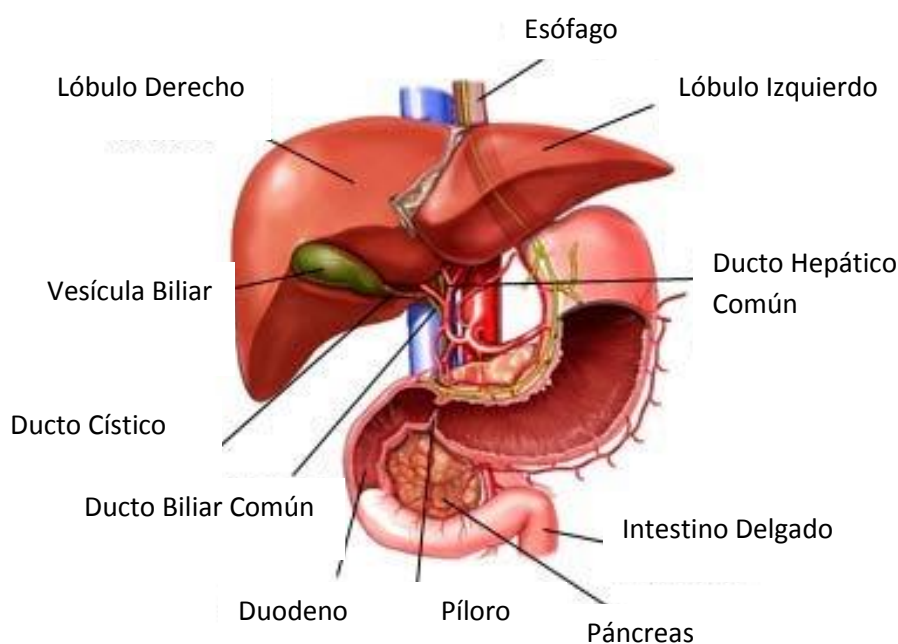


Figura 1. Esquema del Hígado. En este esquema se muestran los lóbulos hepáticos con la vesícula biliar así como los principales aportes de sangre rica en nutrientes provenientes de los órganos abdominales para su metabolismo [1].

Básicamente el hígado realiza tres funciones principales: vasculares, metabólicas y secretoras. En el papel vascular funciona como reservorio de sangre, debido a que puede almacenar hasta 1 litro de sangre dentro de sus venas y capilares que puede liberar en caso de una pérdida en el volumen sanguíneo [3].

La entrada sanguínea principal del hígado es la vena porta (aproximadamente 75%), que transporta sangre rica en nutrientes y que es el resultado de la fusión de muchas venas provenientes del estómago y del intestino para tener una entrada común.[4]

La sangre pasa a los espacios porta, dentro de cada lóbulo de manera que vascularizan la estructura del hígado para entrar al sinusoides hepático donde

se llevan a cabo todos los procesos metabólicos por medio del lobulillo hepático donde se describe su irrigación en la Figura 2 [4].

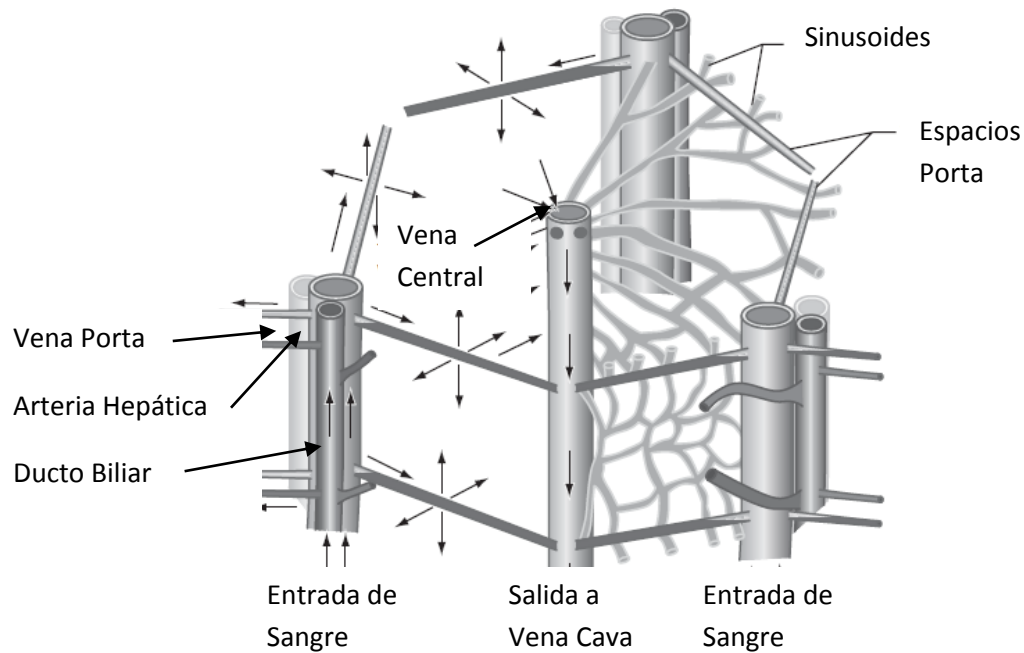


Figura 2. Esquema de la irrigación del lobulillo hepático y su división sinusoidal de acuerdo a las ramificaciones de las vénulas dentro del hígado [4].

El lobulillo hepático es la estructura fundamental del hígado ya que todas las funciones hepáticas son realizadas dentro de esta arquitectura poligonal conformada principalmente por las células parenquimatosas o hepatocitos que constituyen aproximadamente el 80% de la composición celular del hígado, siendo el 20% restante una composición de células no parenquimatosas que brindan andamiaje estructural y protección a las funciones hepáticas [2].

La disposición celular del lobulillo se basa en la vena central que es la vena donde se vierte toda la sangre que viene de los hepatocitos que están formando cordones o cadenas dobles uno tras otro mostrando que están recubiertos en su cara funcional por células endoteliales que están agrupadas a manera de filtros permitiendo el flujo sanguíneo formando los sinusoides hepáticos y por su cara no funcional formando canalículos biliares por donde secretan las sales biliares, es por esta razón que se dice que el hepatocito está polarizado biológicamente como se muestra en la Figura 3 [2].

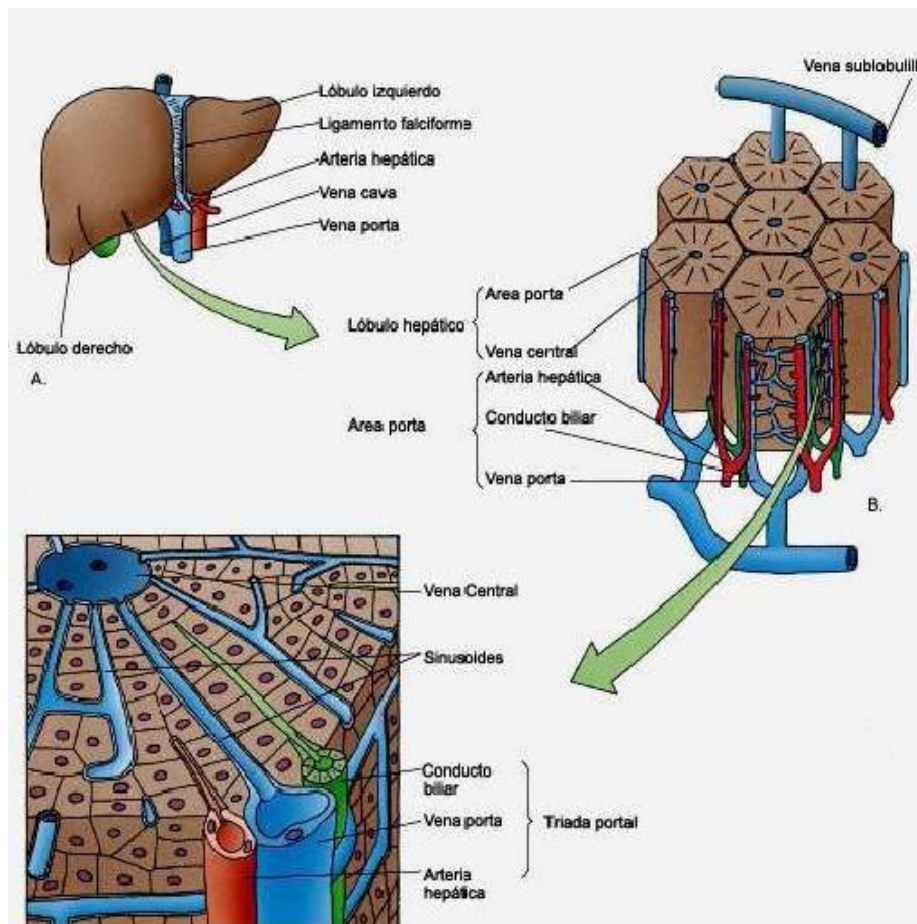


Figura 3. Esquema del Lobulillo Hepático y su morfología dentro del hígado así como la distribución de los endotelios y canales de flujo sanguíneo [4].

La parte metabólica del hígado la llevan a cabo las células parenquimatosas llamadas Hepatocitos, dichas células ayudan a metabolizar los carbohidratos para almacenarlos en forma de glucógeno y convertir la fructosa y galactosa en glucosa [3]. Del metabolismo de los carbohidratos se puede generar glucógeno para su almacenamiento, proceso conocido como glucogenogénesis, y posterior uso en la regulación de los niveles de glucosa en la sangre [2].

En cuanto a los lípidos, los hepatocitos no son las únicas células capaces de metabolizar las grasas pero si son las más rápidas, produciendo la mayor parte de las lipoproteínas y el colesterol [4].

La función metabólica más importante de los hepatocitos es el metabolismo de proteínas entre las que destacan [4]:

- Desaminación de aminoácidos.
- Síntesis de urea a partir del amoniaco presente en el organismo.
- Producción de factores de coagulación.
- Producción de albumina.

Otras funciones características del hígado son [3]:

- Almacenamiento de vitaminas.
- Almacenamiento de hierro.
- Bioactivación o detoxificación de fármacos.
- Etiquetado enzimático para la eliminación de residuos.
- Auto-regeneración.

En la parte funcional excretora del hígado se tiene principalmente la producción y secreción de la bilis que está compuesta generalmente de agua, colesterol, sales biliares y pigmentos biliares en proporciones determinadas, la bilis corre a través de los ductos biliares en sentido opuesto a la circulación hepática para ser vaciada en el intestino delgado [4].

La bilis funciona como detergente y emulsificante de las grasas en el intestino delgado para facilitar su metabolismo, ayuda a desechar la bilirrubina y el colesterol del organismo y funciona como regulador del pH dentro del intestino delgado [2].

Las células que conforman la estructura del hígado básicamente son:

- Hepatocitos: Son las células más grandes del cuerpo, miden entre 20 y 30 micrómetros de diámetro, y llevan a cabo todas las funciones del hígado como órgano a escala celular. Cada célula presenta tres dominios membranosos específicos dependiendo de la función a realizar [2]:
 - La cara sinusoidal: Ocupa el 70% de la superficie total del hepatocito, cuenta con microvellosidades que se extienden en el espacio de Disse, el cual es el espacio que se encuentra entre las células endoteliales y los hepatocitos. En esta cara es donde se vierten al torrente sanguíneo los nutrientes y productos sintetizados que vienen del hepatocito [4].
 - La cara canalicular: Es la cara que da a los canaliculos biliares por donde el hepatocito segrega los desechos de la hemoglobina procesada [2].
 - La cara lateral: En esta cara es donde se dan las uniones entre hepatocitos y constituye una barrera natural entre el espacio de Disse y el canaliculo biliar, y es donde se encuentran las uniones gap o canales de comunicación intercelular de los hepatocitos [4].
- Células Endoteliales: Estas células forman capilares específicos del sinusoides hepático, se encuentran juntas pero sin llegar a cerrarse de manera completa formando los espacios conocidos como fenestraciones, mismos por los que pasa la sangre que ha sido monitoreada por las células de Küpffer. Son las responsables de generar los sinusoides así como la vena central y constituyen el 10% del total celular [2].

- **Células Estelares o células Ito:** Estas células se encuentran en el espacio de Disse en contacto con los hepatocitos y las células endoteliales, componen aproximadamente del 5 al 8% del porcentaje celular dentro del hígado, estas células son las encargadas de almacenar retinol en forma de ester de retinil en condiciones normales, ya que durante una lesión o señal de alerta la célula pierde su fenotipo y se comporta como miofibroblasto y comienza a producir proteínas de matriz extracelular para intentar proteger a los hepatocitos [2].
- **Células K pffer:** Son los macrófagos residentes del hígado que ayudan a monitorear y limpiar la sangre que pasa por el sinusoides hepático, ya que se localizan en los sinusoides para no permitir que pasen cuerpos extraños (microbios y bacterias) a los cordones de hepatocitos [4].
- **Células Pit:** Son linfocitos granulares que también son llamadas células asesinas naturales, que ayudan a las células de K pffer ya que tienen funciones macr fagas por lo que brindan protección antiviral al hígado [4]. Ver figura 5.

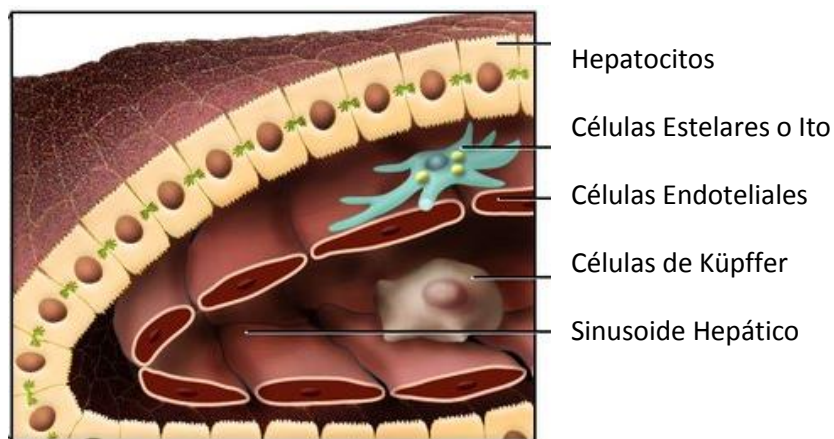


Figura 5. Esquema de la constitución y distribución celular en el sinusoides hepático [3].

La estructura microscópica del hígado está ligada a la funcionalidad inmune debido a que por recibir la sangre con productos de la digestión, las células parenquimatosas (hepatocitos) est n expuestas a una gran cantidad de antígenos y sustancias nocivas para las células, estas estructuras son los sinusoides hepáticos [5].

Cuando se detecta por medio de las células inmunes del hígado (Células Pit y K pffer) la presencia de antígenos o sustancias tóxicas, las células endoteliales reaccionan formando un capilar continuo sin fenestrillos entre las membranas celulares reduciendo el flujo de plasma y moléculas hacia los hepatocitos [5,6].

Un gran número de las enfermedades hepáticas se deben en gran medida al aumento de resistencia al flujo sanguíneo dentro del sinusoides, entre las que destacan la cirrosis, algunas hepatitis virales, el hígado graso, entre otras [6,7]. Este bloqueo que no permite el flujo de la sangre se debe en gran medida al cambio fenotípico de las células estelares que al recibir las señales de una agresión dejan de tener la función de almacenamiento de lípidos y retinol, por lo que comienzan a producir matriz extracelular para ayudar a proteger los hepatocitos, generando proteínas de matriz extracelular que impide el libre flujo sanguíneo, como se puede observar en la Figura 6 [7-10].

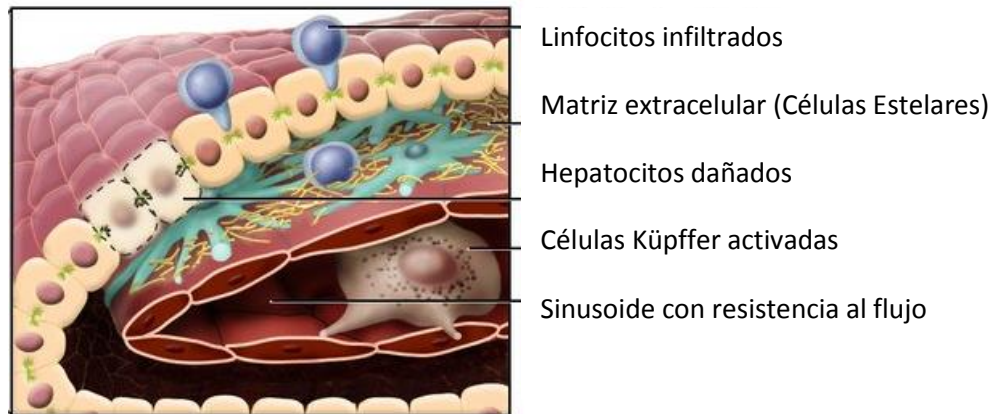


Figura 6. Activación de las células no parenquimatosas en un sinusoides dañado, provocando la obstrucción de los endotelios [3].

Las enfermedades hepáticas crónicas, constituyen uno de los principales problemas de salud en el mundo, debido a su alta morbilidad y mortalidad. En México, la enfermedad crónica del hígado ocupa el cuarto lugar como causa de muerte, se estima que hay alrededor de 10 mil pacientes con insuficiencia hepática crónica que esperan un trasplante de hígado[11,12].

Actualmente el único método para combatir un fallo hepático agudo o un daño por hígado cirrótico, consiste en realizar un trasplante hepático; debido a la escasez de donadores de órganos se ha recurrido a desarrollar sistemas de soporte hepático temporal con la finalidad de brindar ciertas funciones hepáticas a los pacientes que se encuentran en espera de una rehabilitación hepática o la llegada del órgano a trasplantar. [13]

Estos sistemas o hígados bioartificiales, consisten en cultivos de células hepáticas funcionales que permitan dar un soporte vital temporal a los pacientes con fallos hepáticos mientras esperan un donador [13]. La técnica empleada es conocida como diálisis hepática, la cual consiste básicamente en extraer la sangre del paciente con daño hepático para mezclarla con anticoagulantes para realizarle una plasmaféresis y obtener únicamente el plasma, el cual a su vez es pasado por el recipiente que contiene las células hepáticas que ayudarán a verter en el plasma algunas proteínas propias del hígado, realizar ciertas biotransformaciones de metabolitos y fármacos y realizar el etiquetado enzimático para que puedan ser excretadas del organismo ciertas sustancias tóxicas tal como se muestra en la Figura 7 [14].

Una vez que el plasma fue procesado por las células hepáticas, pasa a un filtrado para evitar una contaminación celular y se vuelve a mezclar con la sangre que fue separada del plasma para reinyectarla al organismo del paciente.

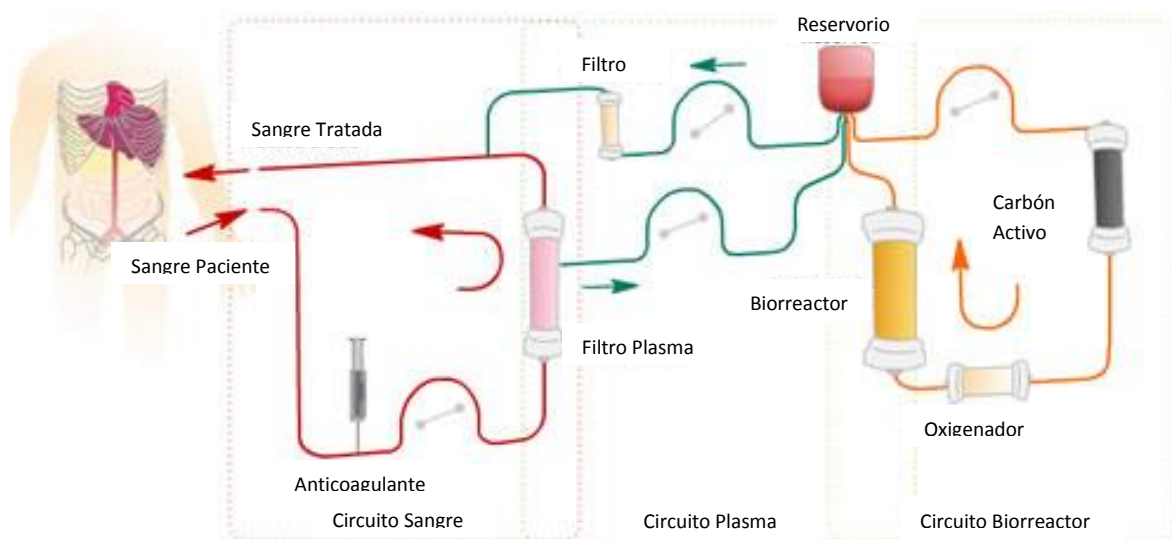


Figura 7. Esquema de la diálisis hepática con los tres circuitos que la componen (circuito sanguíneo, circuito plasmático y circuito del biorreactor) [13].

Existen diferentes tipos de hígados bioartificiales los cuales se clasifican de acuerdo a los siguientes puntos:

- Fuente de las células a emplear.
- Sistema de sembrado celular.
- Tipo de biorreactor a utilizar.

Los hígados bioartificiales más utilizados y que se encuentran en fases clínicas utilizan hepatocitos porcinos aislados o en cocultivo con líneas celulares hepáticas de origen humano tales como HepG2 y C3A sobre andamios tridimensionales en busca de conservar la polaridad de las células para conservar sus funciones fisiológicas [15].

Estos cultivos celulares se basan en la premisa de que un hepatocito en condiciones óptimas es un modelo aproximado al funcionamiento de un hígado completo, por lo que se realizan cultivos celulares que intentan reproducir modelos más productivos y cercanos a la fisiología hepática [15].

Todos los procesos hepáticos se llevan a cabo en el sinusoides, por lo que es importante conocer el funcionamiento de los hepatocitos y su interrelación con las células endoteliales para poder desarrollar un cocultivo hepático funcional, ya que los hepatocitos al ser células polarizadas necesitan tener un andamio tridimensional que les permita estar ancladas y proliferar sobre el andamio y a su vez permitir una comunicación con el resto de las células que conforman y nutren el tejido hepático [16].

En los cocultivos de células hepáticas y células endoteliales en tres dimensiones se ha reportado un incremento en la producción y absorción de sustancias tales como:

- Absorción de glucosa presente en el medio de cultivo. [16]
- Absorción de lactato [17]
- Producción de albúmina [17, 18]
- Síntesis de urea [16]
- Realización de biotransformaciones más eficientes [16, 17, 19]

Por lo que un cultivo tridimensional de células endoteliales con células hepáticas sobre biomateriales modificados superficialmente, nos permitiría obtener un modelo que permita la comunicación intercelular que genera el buen funcionamiento de los hepatocitos; al ser en tres dimensiones permitiría conservar la polaridad biológica de ambos tipos celulares asegurando así su buen funcionamiento para compararlo después con los cultivos aislados, y comprobar un andamio celular de ácido poliláctico modificado con polipirrolidino, que permite el crecimiento celular y la intercomunicación mejorando las propiedades de adherencia y tiempo de degradación, funcionalidad bioquímica y de detoxificación.

Estado del arte

La mayoría de los conocimientos que tenemos de la fisiología celular humana, se han obtenido a través de modelos biológicos bien estandarizados que se estudian y trabajan *in vitro*, estos modelos ayudan a comprender los mecanismos y procesos que se llevan a cabo en el organismo [20].

El metabolismo celular es el conjunto de procesos químicos que permiten nutrir y alimentar a la célula, así como los procesos característicos de producción de proteínas y de degradación de desechos que se presentan para verificar su funcionamiento [21]. En el estudio fisiológico de los modelos celulares existen 2 vertientes de estudio dependiendo de la procedencia de las células, ya que, si provienen de un tejido extraído de un animal recibe el nombre de cultivo primario el cual viene acompañado de células de diferentes tipos que estén presentes en el tejido seleccionado y presentan un tiempo de vida limitado, ver Figura 8[22].

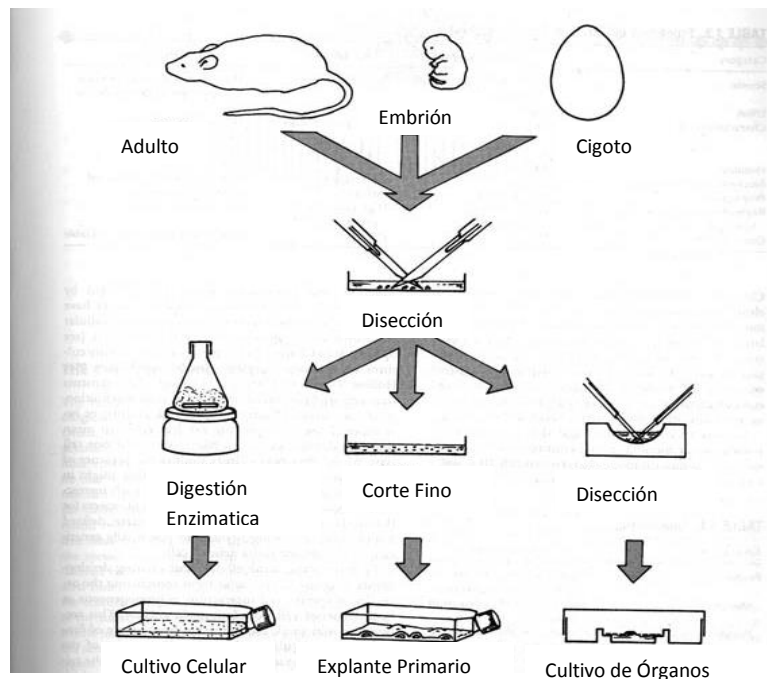


Figura 8. Diferentes técnicas de obtener un cultivo primario a partir de especímenes adultos, embriones o cigotos, así como los diferentes tipos de cultivo celular por medio de enzimas o porción de tejido de explante [22].

El comportamiento de los hepatocitos provenientes de cultivos primarios son un buen modelo del tejido hepático, pero es necesaria la comunicación con otras células del tejido para que no pierdan su fenotipo y por lo tanto su eficiencia fisiológica al ser cultivados *in vitro* [23]. Esto es debido a la presencia de células alimentadoras que ayuden al hepatocito a conservar su fenotipo y la microestructura polarizada de la membrana celular [24].

La otra vertiente es el uso de líneas celulares o células modificadas, las cuales son células con una capacidad de crecimiento indefinido, y que brindan células que mantienen algunas de las características de su contraparte *in vivo*, por lo que se han considerado un buen modelo biológico, además de que muchos procesos que no muestran las líneas celulares pueden ser inducidos mediante la aplicación de suplementos en el medio de proliferación como se muestra en la Figura 9 [22].

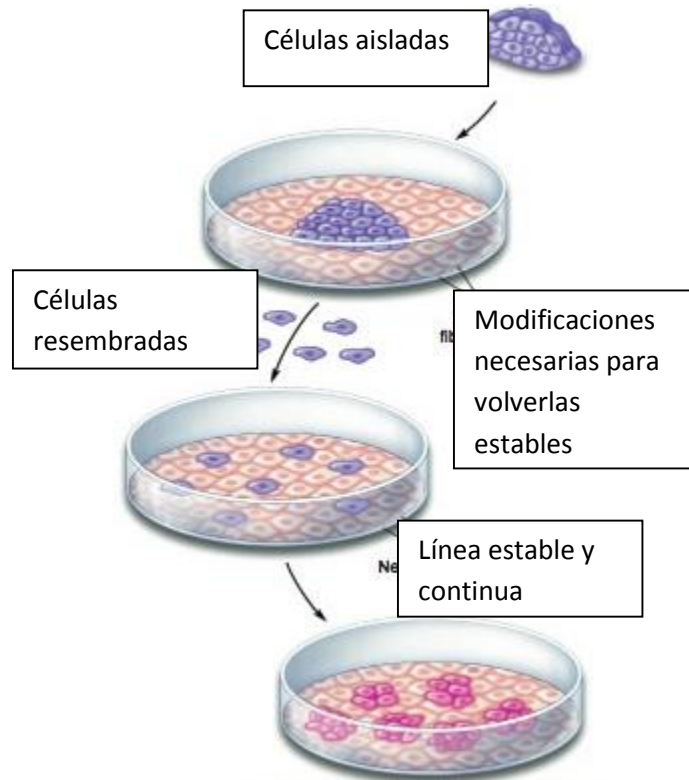
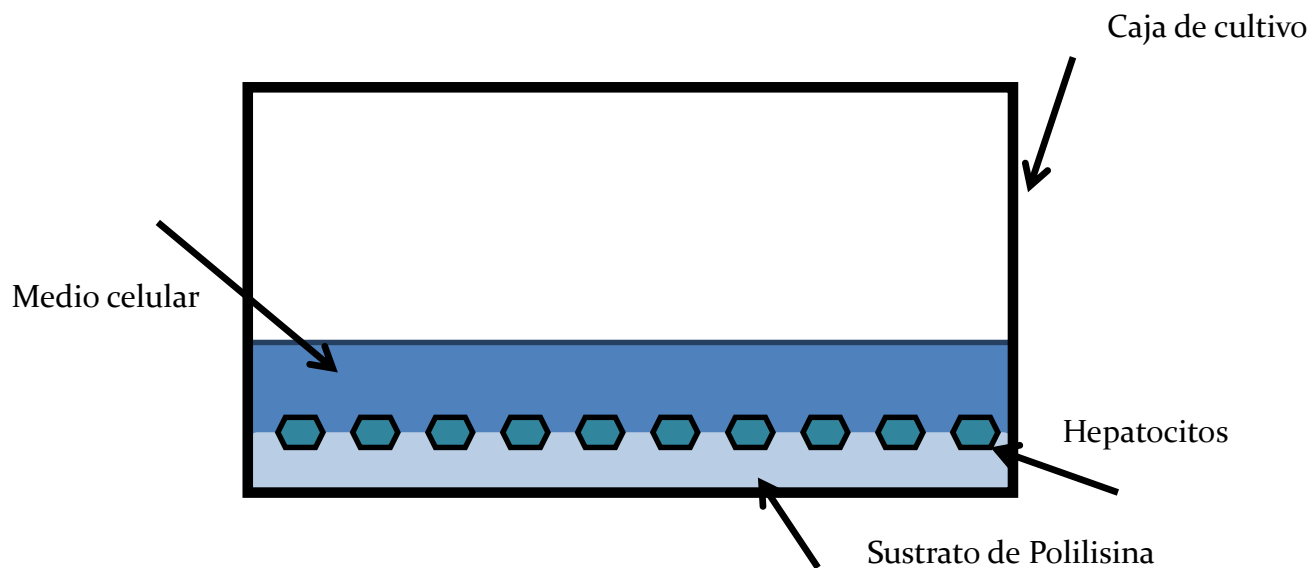


Figura 9. Esquema de la obtención de una línea celular, la cual se obtiene a partir de un cultivo primario, el cual es modificado para generar una proliferación indefinida y que conserve las características pasaje tras pasaje para utilizarse como modelo de estudio bien definido y caracterizado del tejido en cuestión.

El uso de la técnica de cultivo celular nos permite controlar las condiciones fisiológicas y fisicoquímicas entre las que destacan: el control del pH, la presión osmótica, las concentraciones de gases (oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno, etc.) en el ambiente de proliferación de las células a estudiar y respecto a las fisiológicas controlamos el suministro de los nutrientes con los cuales crecerán las células, así como las hormonas necesarias para mantener un ambiente celular óptimo [22].

La mayoría de las células necesitan estar adheridas a una superficie para poder realizar sus funciones biológicas y mantener su morfología característica, ya que todas las células en suspensión presentan una morfología esférica, es por esta razón que las cajas de cultivo celular presentan en su superficie un tratamiento de sustratos de polilisina que proporciona una carga ligeramente negativa que permite un correcto anclaje de las células, como se muestra en la Figura 10 [21-25].



Esquema de cultivos celulares

Figura 10. Anclaje de las células a las cajas de cultivo tratadas para promover la adherencia de las membranas celulares.

Para la parte fisiológica, los medios de cultivo deben contener nutrientes que permitan la proliferación y el mantenimiento óptimo de las células, es por eso, que un medio de cultivo está formado básicamente por azúcares, sales inorgánicas, nutrientes tamponados e isotónicos, aminoácidos, metabolitos y un indicador de pH que es el rojo fenol que permite detectar el momento en que se está acidificando el medio de cultivo y cambiarlo por medio fresco, ver Figura 11 [25, 26].



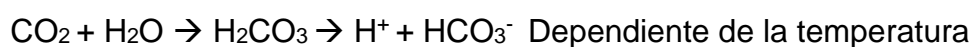
Figura 11. Campana de flujo laminar, donde se lleva a cabo el sembrado de células HepG2.

Estos medios de cultivo deben ser suplementados a su vez con sueros de mamíferos que brindan ciertos factores de crecimiento y hormonas complementando el medio celular que facilitan el anclaje y proliferación a las células y antibióticos (penicilina y estreptomycin) y antimicótico, para prevenir

cualquier tipo de contaminación que pueda suceder dentro del ambiente estéril de trabajo [23].

Los cultivos celulares deben estar en presencia de CO₂, debido a que los medios de cultivo son amortiguados con bicarbonato de sodio, y al no estar en presencia del CO₂, se comienza a alcalinizar el medio de cultivo, lo que produce un daño en la membrana celular y su fisiología [22].

La temperatura juega un papel crucial tanto para la presencia del CO₂ disuelto en el medio de cultivo como para la correcta proliferación de las células cultivadas, ya que se busca tener una aproximación a la temperatura del animal del que procedan las células a trabajar y el CO₂ disuelto en un medio con presencia de bicarbonato de sodio regula el pH dependiendo de la temperatura a la que este el medio, ya que al elevar la presencia de CO₂ disminuye el pH de la solución [22].



El modelo de hepatocito más utilizado actualmente es la línea celular de hepatoblastoma denominada HepG2, que conserva una gran variedad de funciones hepáticas y secreción de proteínas entre las que destacan:

- Producción de alfa-feto proteína [26].
- Síntesis de urea [26]
- Así como algunas biotransformaciones de fármacos.

Estas células crecen en monocapa o bidimensionales, por lo que los modelos tridimensionales buscan darle propiedades de volumen al tejido a estudiar mismas que son un modelo más cercano al tejido *in vivo*, debido a que son muy pocos los tejidos que crecen en monocapas dentro del organismo.

Existen líneas celulares que solo se cultivan en 2 dimensiones para generar una reserva celular y solo en tres dimensiones es como presentan sus principales funciones y arreglos estructurales, tal es el caso de las células endoteliales HUVEC, que provienen del cordón umbilical humano y que solo en cultivos celulares con andamios tridimensionales presentan la generación de capilares [27].

Los andamios para el cultivo celular tridimensionales deben estar conformados por materiales porosos biocompatibles, que permitan el anclaje de las células sobre el material y su proliferación volumétrica, además de permitir un flujo del medio de cultivo dentro del material y tener una resistencia mecánica similar al órgano en cuestión. Poco a poco la masa de células va aumentando y va llenando el espacio, organizándose y adquiriendo la forma del armazón que a su vez imita la estructura del órgano [25].

Se han llevado a cabo numerosos estudios e investigaciones de implantes biodegradables que permitan solucionar las dificultades estructurales de los cultivos celulares. Los polímeros y copolímeros de Ácido Poliláctico (PLA) y Ácido Poliglicólico (PGA) son los más empleados como andamios tridimensionales, gracias principalmente a su biocompatibilidad y su textura porosa [28].

Dichos materiales sirven de andamios debido a que en la superficie de los mismos están presentes radicales orgánicos que permiten el anclaje de las células, en el caso de los hepatocitos el ácido Poliláctico funciona de andamiaje, debido a que el monómero de ácido láctico en condiciones normales se dirige específicamente al hígado para ser metabolizado, por lo que al ser específico su enlace a los hepatocitos, éste es usado como matriz extracelular favoreciendo una adecuada adhesión celular [25].

Se han probado técnicas como la radiación ultravioleta UV, depósito por plasma, “grafting” químico, etc., buscando agregar grupos funcionales a los andamios que mejoren la adherencia al sustrato celular y que reduzca cualquier proceso de toxicidad, es decir que incremente la biocompatibilidad a nivel biomaterial-tejido sin comprometer la estructura y propiedades del andamio original [29].

La polimerización por plasma de monómeros orgánicos ionizados son parte del desarrollo de las aplicaciones biomédicas. Las técnicas espectroscópicas de caracterización de plasma han sido muy utilizadas para conocer las sustancias que lo componen, también se ha obtenido información acerca de las posibles reacciones que suceden durante un proceso de deposición por plasma [30].

Para realizar estos procesos es necesario utilizar un reactor de vacío (10^{-2} a 10^{-3} bar) para ser capaz de ionizar el aire. Una vez obtenido el vacío, se introduce el aire en la cámara de tratamiento y se ioniza con la fuente de energía apropiada, causando la aceleración de electrones libres y el pirrol por ser una amina cíclica al polimerizarse permite obtener una superficie rica en aminas que favorecen el anclaje celular a la estructura [31].

La ventaja que ofrece la polimerización por plasma es que no modifica las propiedades del material y permite aumentar el tiempo de biodegradación del andamio tridimensional brindándole una estructura insoluble y que favorece la proliferación celular [25].

Al buscar generar un modelo más aproximado a los tejidos *in vivo*, se ha buscado cultivar las células parenquimatosas del hígado junto con algún tipo de las células no parenquimatosas, debido a que al secretarse proteínas y sustancias de comunicación entre las células se ha reportado que el funcionamiento de los hepatocitos es mejor que cultivándolos de manera aislada [28].

Otro aspecto importante en la organización de las células endoteliales es la polaridad biológica que conlleva su alineación para formar capilares y poder diferenciar las caras del lumen del capilar y la cara apical misma diferenciación que provoca la organización de los fenestrillos o fenestraciones[31].

Dicha polaridad y la formación de capilares solo es posible diferenciarla en cultivos 3D, debido a que al realizar un cultivo en monocapa de células HUVEC, su proliferación llega a la confluencia sin lograr determinar la formación de capilares [31].

La formación de capilares nos permite generar un modelo más aproximado a la situación *in vivo* y a su vez regular la estructura y su comunicación con las

células que deben interactuar, para conservar la polaridad biológica que se mencionó anteriormente y respetar la cara que está en comunicación directa con las células parenquimatosas en este caso del hígado y la cara que recibirá los nutrientes [32].

Como se ha demostrado que la viabilidad de los cultivos de hepatocitos, así como la producción de ciertas proteínas específicas del hígado aumenta con el simple hecho de agregar al cultivo un micro-filtrado del medio de cultivo similar al que efectúan los endotelios *in vivo*, sin recibir de golpe los fluidos y nutrientes esenciales para su mantenimiento [33].

Entre los trabajos realizados con cultivos tridimensionales hepáticos se pueden mencionar los realizados en la UAM Iztapalapa por el grupo de Ingeniería de Tejidos desde el 2009. Se utilizaron diferentes tipos de andamios biocompatibles los cuales fueron modificados en su superficie con una capa delgada de polipirrol sintetizado por plasma, a los cuales fueron sembradas células hepáticas de la línea celular HepG2 para obtener un cultivo tridimensional, el cual reporto una producción de proteínas en aumento conforme pasaba el tiempo de cultivo [25]. En este trabajo cabe destacar que el anclaje de las células se vio favorecido en un andamio de PGA-PGLA modificado en su superficie con polipirrol, al compararlo con el anclaje de su contraparte sin modificar ya que en este material las células permanecían en suspensión o se adherían al fondo de las cajas de cultivo ver Figura 12 [25].

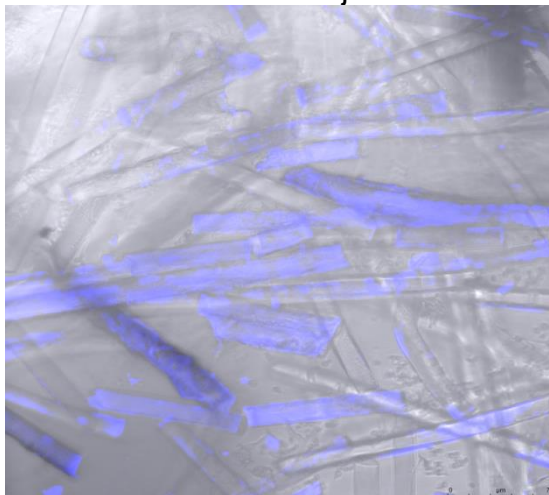


Figura 12. Esponja de PGA-PGLA recubierta con Polipirrol sembrada con Hepatocitos (HepG2) y teñidas con el método de tinción de Hoescht [25].

La ciencia de materiales también ha permitido generar modelos de sinusoides hepáticos considerando a las células endoteliales como un microfiltrado, creando una superficie polimérica con pequeños canales para generar un sistema de microfluido, simulando la resistencia al flujo de los fenestrillos dentro del cual fue sembrado un cordón de hepatocitos de rata de 500 micras de largo por 50 micras de ancho donde el medio de cultivo pasaba al exterior del filtro como se muestra en la Figura 13 [33].

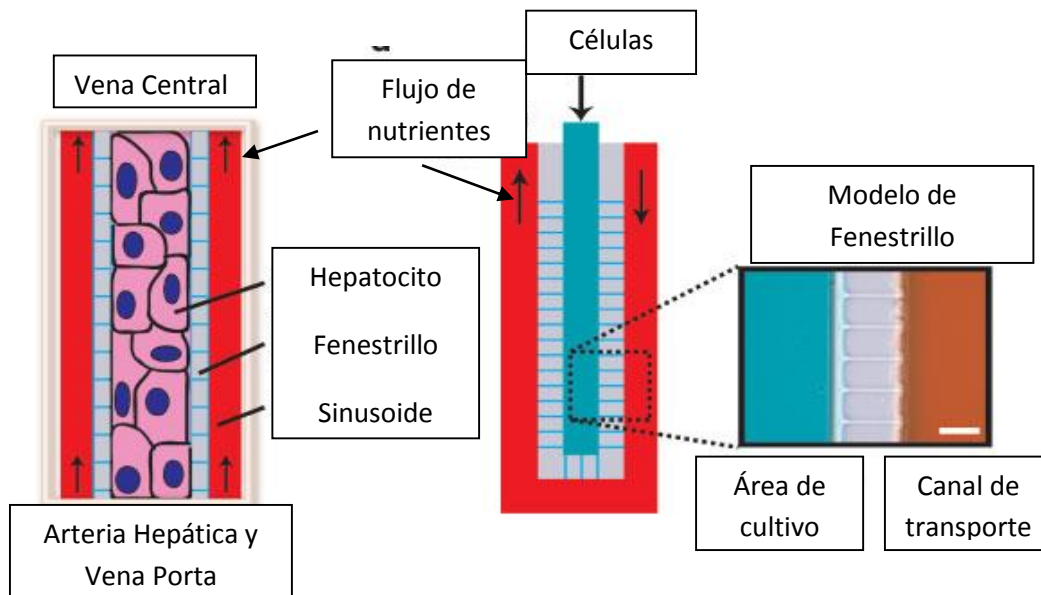


Figura 13. Esquema del micro-filtrado realizado por una capa de biopolímeros para simular el sinusoides hepático.

Esta barrera permite mantener por más tiempo la polaridad biológica de los hepatocitos primarios y mejorar la biotransformación de fármacos al aumentar la viabilidad celular en periodos largos de cultivo [33].

Este material sirve para modelar el filtrado realizado por las células endoteliales pero es posible utilizar células endoteliales verdaderas con la finalidad de generar capilares que cumplan con las características propias de los sinusoides, tales como la polaridad biológica del capilar ya que se ha demostrado que al realizar un cultivo tridimensional de células endoteliales del tipo HUVEC, se forman lúmenes de manera natural y esto debido a un gen presente en las células que al ser suprimido genera un cultivo celular con lúmenes deformados o inexistentes como se muestra en la Figura 14 [31].

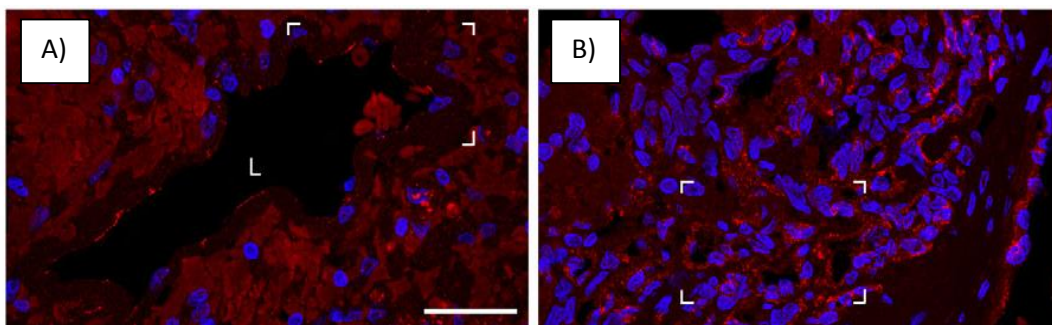


Figura 14. Células endoteliales (HUVEC) cultivadas en tres dimensiones donde A) se muestran células formando lúmenes de acuerdo a la polaridad biológica, en B) se muestran células con el gen CCM1 suprimido por lo que los lúmenes se forman de manera ineficiente.

Estas células fueron sembradas sobre geles de colágena en 3D para demostrar que solamente en un cultivo volumétrico este tipo de células son capaces de formar capilares, ya que al sembrarse en 2 dimensiones la proliferación laminar no presenta la formación automática de lumen [31].

Los cultivos celulares se pueden llevar a cabo de diferentes formas dependiendo las técnicas de recambio de medio utilizado como por ejemplo:

- Medio Estático. Es la técnica bidimensional tradicional donde se utilizan medios en cajas de cultivo tratadas [34].
- Andamios con medio estático. Es una técnica tridimensional donde se utilizan soportes dentro de cajas de cultivo sin flujo de medio [34].
- En suspensión. El medio de cultivo está en constante agitación dentro de un recipiente que contiene a las células para que este fluyendo el medio de cultivo [34].
- Andamios en Flujo continuo. Se utilizan andamios tridimensionales y además se utiliza un flujo dinámico del medio de cultivo ya sea agitación o flujo continuo y son llamados biorreactores. Como se muestran en el esquema de la Figura 15 [34].

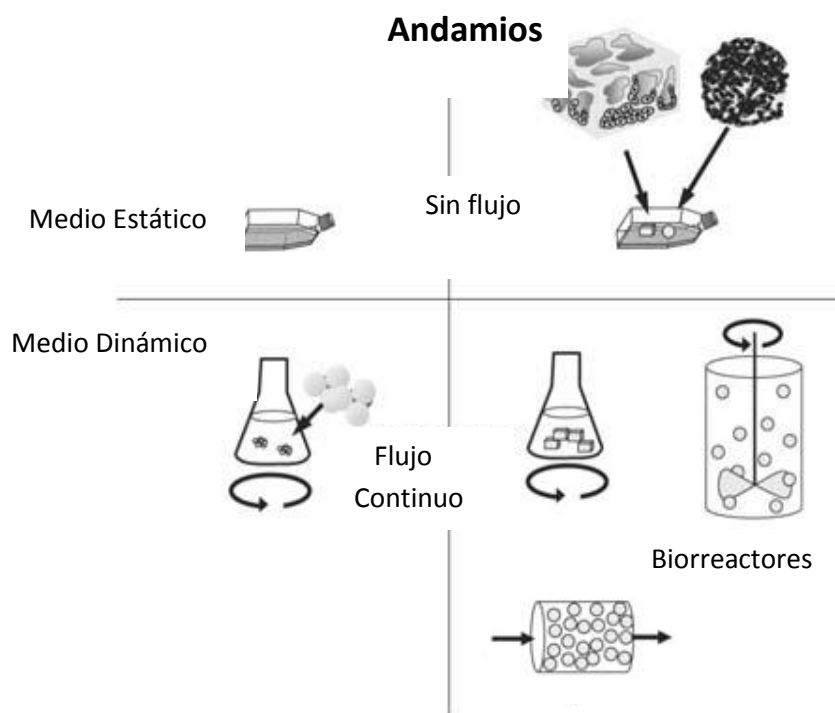


Figura 15. Esquema de los diferentes tipos de cultivos celulares de acuerdo a sus características del recambio de medio de cultivo.

Actualmente los métodos más utilizados en el cultivo celular son los biorreactores que básicamente consisten en un sistema de flujo continuo dentro de un recipiente bien caracterizado el cual está relleno de algún biomaterial que permita la proliferación celular [34, 35]. En estos sistemas se han reportado crecimientos volumétricos más efectivos en comparación con un cultivo estático y tiempos de cultivo más prolongados obteniendo una mayor proliferación celular [35]. Esto en gran medida debido a que dentro del biorreactor no existen ajeteos externos al ser un sistema dinámico cerrado y que mantiene en constante flujo el medio de cultivo de manera similar al flujo sanguíneo permitiendo controlar la temperatura, el pH del medio y la concentración de

CO₂ del cultivo para obtener condiciones óptimas para las células como se explicó anteriormente [35].

Un biorreactor consta de ciertas partes básicas que se muestran en la Figura 16 y que se explican a continuación:

- Reservorio de Medio. Es la tarja de almacenamiento del medio de cultivo donde se pueden realizar las mediciones de las sustancias producidas por el cultivo celular y donde se regula el pH del sistema en general [36].
- Bomba Peristáltica. Es un tipo de bomba que permite tener un flujo constante del medio de cultivo sin fluctuaciones que alimente el biorreactor y realice el recambio de nutrientes en las células [36].
- Cartucho. Es el recipiente donde se encuentran los andamios y las células a proliferar para que sea controlado su crecimiento y no exista una contaminación o proliferación celular a lo largo del circuito [36].
- Tomas de aire. Por estar dentro de una incubadora no es necesario tener un control de la mezcla de gases y temperatura en el circuito ya que la incubadora de CO₂ controla estos parámetros y únicamente se necesita que el medio de cultivo que está fluyendo tenga un intercambio de gases con el ambiente de la incubadora para controlar estas variables [36].

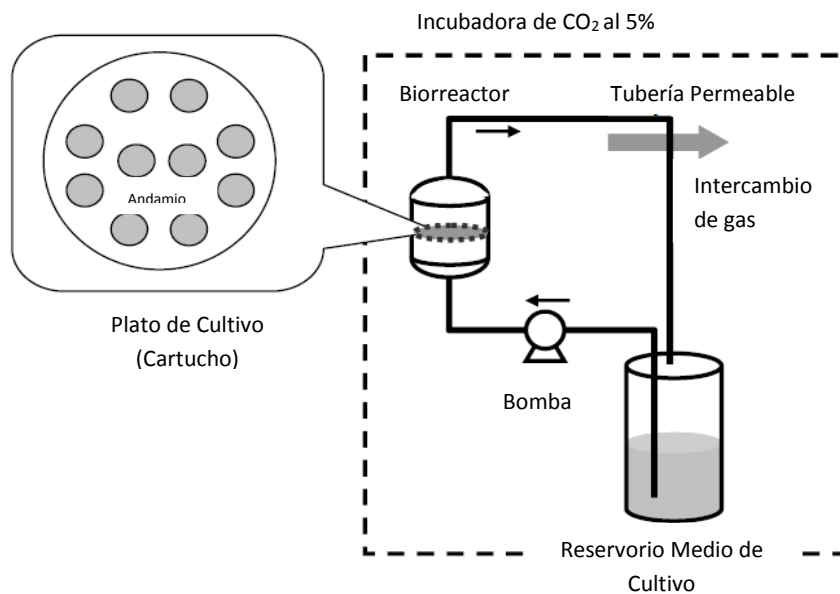


Figura 16. Esquema de un biorreactor de flujo continuo dentro de una incubadora de CO₂.

En busca de modelos más realistas se busca la opción de realizar cocultivos celulares que básicamente son la combinación de 2 o más tipos celulares para que exista una interacción y cooperación entre las células a cultivar, por lo general se siembran las células de interés y el modelo se potencializa utilizando células no parenquimatosas que estén presentes en el tejido *in vivo*.

Entre algunos ejemplos de esta técnica podemos mencionar el cocultivo de células endoteliales con células hepáticas realizado en un biorreactor de flujo continuo donde se tenían por separado en distintos compartimentos un crecimiento volumétrico de células endoteliales que recibía el medio de cultivo

para que estos recibieran los productos de secreción de células endoteliales y al pasar al siguiente compartimento donde se encontraban los hepatocitos realizaran sus funciones metabólicas en un circuito como el que se muestra en la Figura 17 [16].

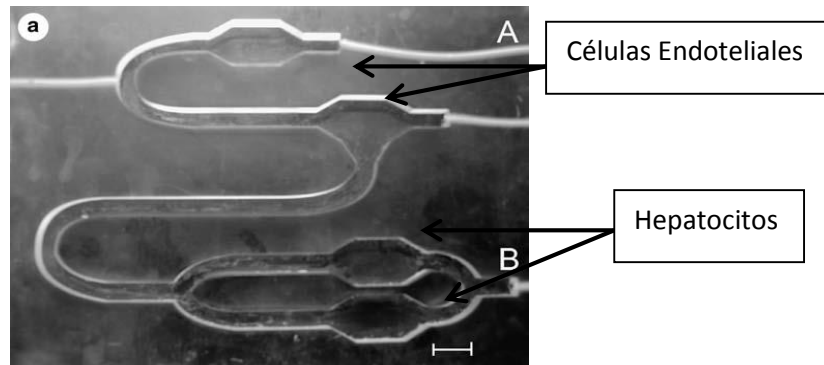


Figura 17. Circuito del biorreactor de flujo continuo de compartimentos separados donde el flujo entra por la letra “A” y pasa a dos reservorios de células endoteliales para continuar hacia los hepatocitos y continuar el flujo indicado por la letra “B”. La barra representa 1 cm.

En el trabajo de Vozzi y cols. [16], se utilizaron células HUVEC y hepatocitos de cultivo primario de roedor sembradas sobre una capa de colágena permitiendo ver un aumento en las funciones fisiológicas de los hepatocitos en cocultivo a diferencia de los hepatocitos aislados, en parámetros tales como:

- Aumento en la absorción de glucosa
- Aumento en la absorción de lactato
- Mayor producción de albúmina
- Mayor síntesis de urea

Por otra parte un cocultivo se puede realizar al mezclar los tipos celulares dentro de un solo andamio en forma de esferoides, tal es el caso del trabajo descrito por Thomas y cols. [28] en el cual fueron sembradas células estelares con hepatocitos sobre un andamio tridimensional de ácido Poliláctico en forma de esferoides [28]. Para lo cual se utilizaron células estelares de rata con hepatocitos del tipo HepG2, sembradas al doble de las células estelares mejorando la viabilidad celular en comparación con los hepatocitos aislados durante 21 días desde su sembrado permitiéndoles una proliferación adecuada dentro del esferoide[28]. Para distinguir las células dentro del esferoide se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas de tinción ya que al estar combinadas las células no es posible diferenciarlas, los reactivos que utilizaron fueron DAPI para teñir los núcleos de ambos tipos celulares y el anticuerpo contra Actina de músculo liso contra rata para localizar las células estelares como se muestra en la Figura 18.

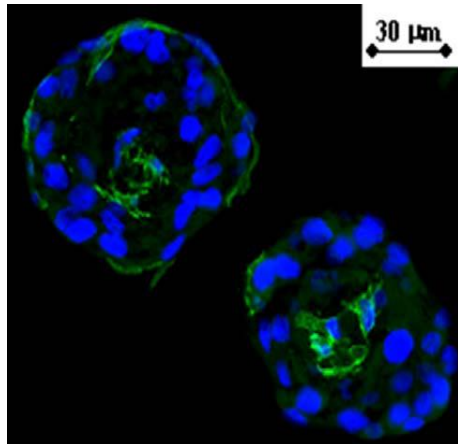


Figura 18. Inmunocitoquímica para identificación celular dentro del esferoide de ácido Poliláctico. Células estelares en color verde y los núcleos celulares de hepatocitos y células endoteliales en azul.

En otro trabajo se describe como se potencializa la funcionalidad de los hepatocitos HepG2 al sembrarlos en cocultivo con células endoteliales HUVEC dentro de esferoides de colágena en un biorreactor de flujo continuo permitiendo obtener esferoides vascularizados además de estar recubiertos por una capa de células endoteliales lo que aumenta la viabilidad celular y aumenta la proliferación celular [17].

Estos esferoides se muestran en la Figura 19 así como el cartucho donde están embebidos los mismos y la tinción inmunocitoquímica de las células.

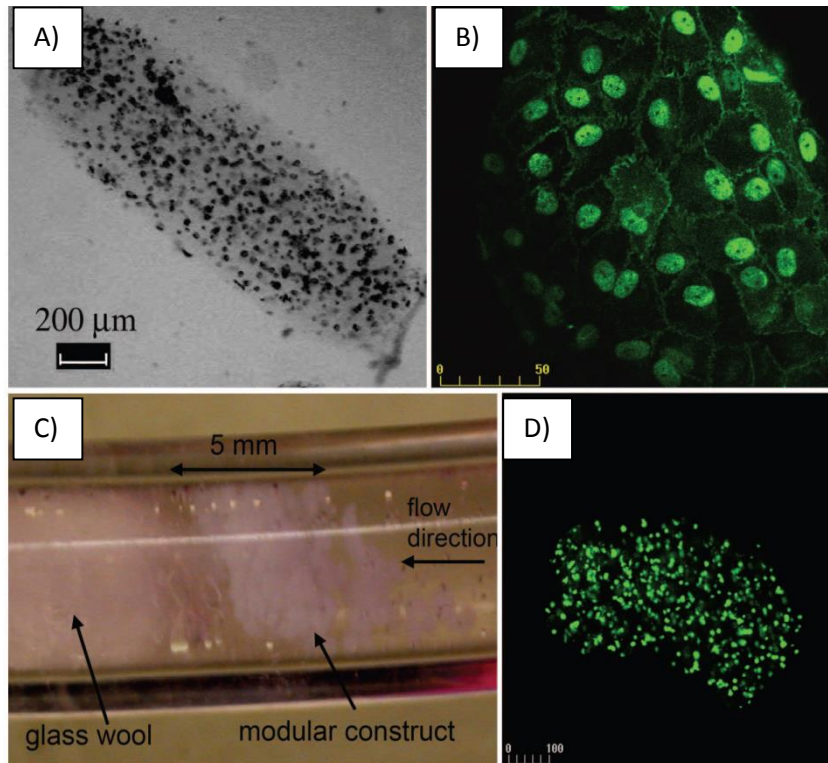
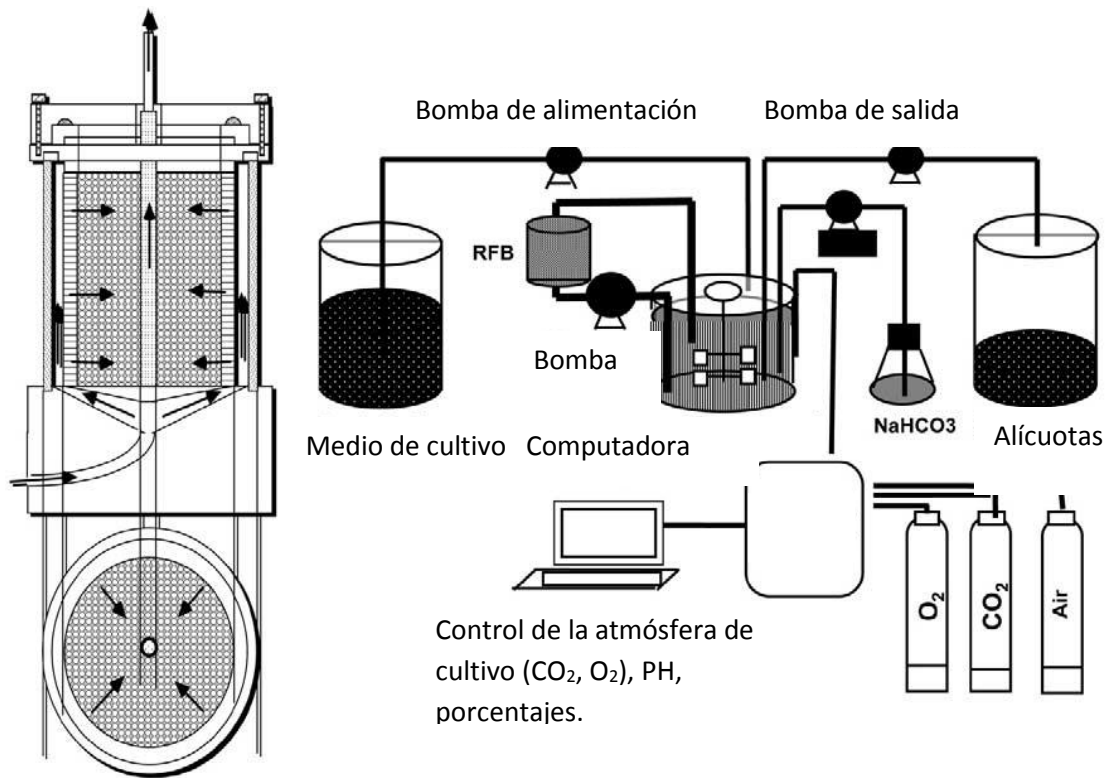


Figura 19. En A) andamios de colágena con células HepG2, en B) células endoteliales con color verde teñidas con cadherina para observar las uniones intercelulares, C) se ve el cartucho con los esferoides sembrados y recibiendo un flujo de medio continuo y en D) la Inmunodetección de las células endoteliales dentro de los esferoides cultivados de color verde.

Una variante en los biorreactores son los biorreactores de flujo radial (BFR), son utilizados actualmente en el cultivo celular tridimensional para generar tejidos hepáticos o renales altamente funcionales, ya que permiten obtener un cultivo volumétrico más abundante en un tiempo menor debido a que mantiene un flujo de medio de cultivo constante entre las células, desde la periferia hacia el centro del biorreactor simulando la vascularización del tejido *in vivo* [37].

En la Figura 20, se muestra el esquema de funcionamiento del BFR, teniendo como parte principal el sistema de control de la atmósfera de cultivo mediante una computadora que mezcla los gases en las proporciones necesarias, así como pH del cultivo. Los cultivos celulares se llevan a cabo sobre andamios porosos de celulosa con 15 ml de medio de cultivo dentro del BFR [37]. Con estas ventajas de por medio es posible tener un cultivo celular durante tiempos prolongados de proliferación, para obtener un volumen de tejido bastante grande para poder probar fármacos y comprobar la funcionalidad fisiológica como tejido estructural y no únicamente como células aisladas [37].



Biorreactor de flujo radial

Esquema del sistema

Figura 20. Esquema general de un biorreactor de flujo radial.

Con este tipo de biorreactores se han realizado cocultivos de células endoteliales, estelares y hepatocitos sobre un material de celulosa, mismo trabajo en el que se reportan un aumento en la producción de albúmina y la síntesis de urea en comparación con hepatocitos aislados en el biorreactor y hepatocitos cultivados únicamente sobre los andamios volumétricos sin usar el biorreactor [19]. El sembrado de las células se realizó en proporciones de 20 millones de células estelares y de hepatocitos y 10 millones de células endoteliales en diferentes días de cultivo para obtener una distribución celular como la que se muestra en la Figura 21 [19].

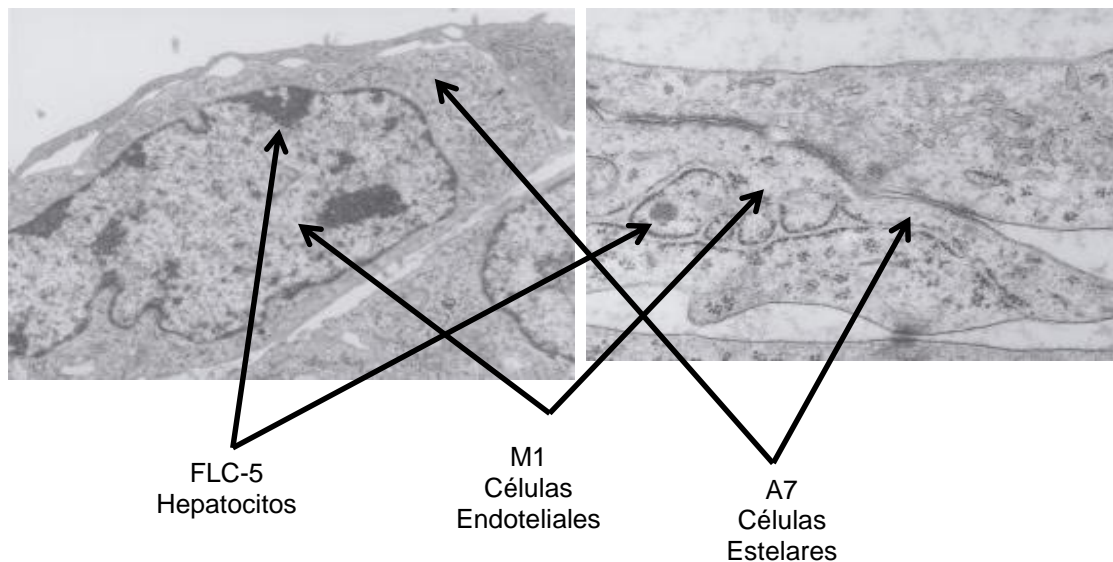


Figura 21. Distribución de las células en la celulosa después de 14 días de cultivo en un biorreactor de flujo radial: (FLC-5) Línea de Carcinoma Hepático, (M1) Línea inmortalizada de Endotelio Sinusoidal, (A7) Línea inmortalizada Estelar.

Estos biorreactores son utilizados para probar y caracterizar los modelos celulares así como los materiales que después son utilizados en los hígados bioartificiales para comprobar su funcionalidad fisiológica en contacto directo con las etapas clínicas.

Los hígados bioartificiales brindan un soporte vital temporal a los pacientes con daños hepáticos que se encuentran en espera de un donador, por lo que es importante conocer la configuración del biorreactor a utilizar, las células que se sembraron y las técnicas de cultivo empleadas en su desarrollo [38].

Los biorreactores utilizados actualmente permiten desarrollar modelos biológicos para el estudio de mecanismos de comunicación celular y llevar a cabo pruebas fisiológicas, el material utilizados en los biorreactores que se encuentran en fase clínica son membranas porosas que permiten el filtrado molecular de metabolitos y nutrientes, evitando así una contaminación celular en el paciente [38]. Las membranas poliméricas mantienen por largos periodos de tiempo las funciones metabólicas y las funciones de biotransformación de los hepatocitos de cultivos primarios aislados en el sistema artificial, en estos sistemas han sido probados fármacos y sus biotransformaciones tales como el diclofenaco, paracetamol, etc. Cuyos efectos y funciones específicas no se conocían a fondo [38].

La principal limitante en el desarrollo de órganos artificiales ha sido la producción de tejido *in vitro* para obtener modelos biológicos, por lo que el uso de biorreactores nos permite realizar cultivos celulares por largos periodos de tiempo para obtener un gran volumen de células proliferativas y comprobar su viabilidad y funciones específicas.

La principal fuente de células en los hígados bioartificiales son las células hepáticas porcinas como se muestra en el esquema de la Figura 22, debido en

gran medida a que las células humanas son escasas para este tipo de estudios por lo que un avance importante es el cocultivo de líneas celulares provenientes de carcinomas humanos con hepatocitos porcinos.

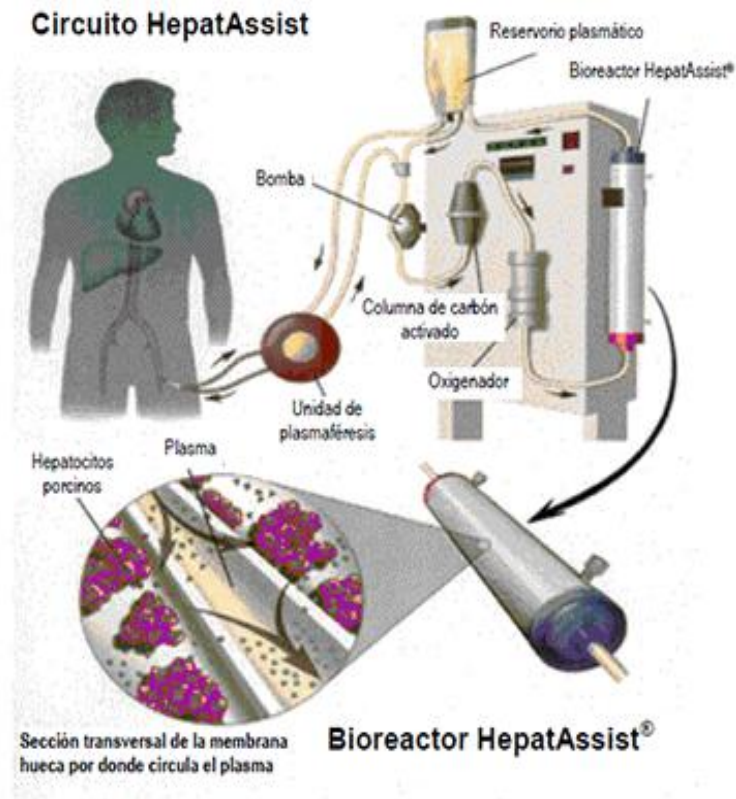


Figura 22. Esquema del sistema “HepatAssist” hígado bioartificial que se encuentra en la fase clínica II y el cual utiliza esferoides de colágena de células hepáticas porcinos sobre membranas de celulosa para realizar la diálisis hepática [38].

Las diferencias entre hígados bioartificiales en fase clínica se encuentran principalmente en el sembrado celular y las células utilizadas en el reservorio, ya que los materiales de sembrado cumplen las características de ser volumétricos y permitir el flujo de nutrientes hacia las células, estos sembrados se explican en las imágenes siguientes así como las células empleadas en cocultivo ver Figura 23 y 24[38].

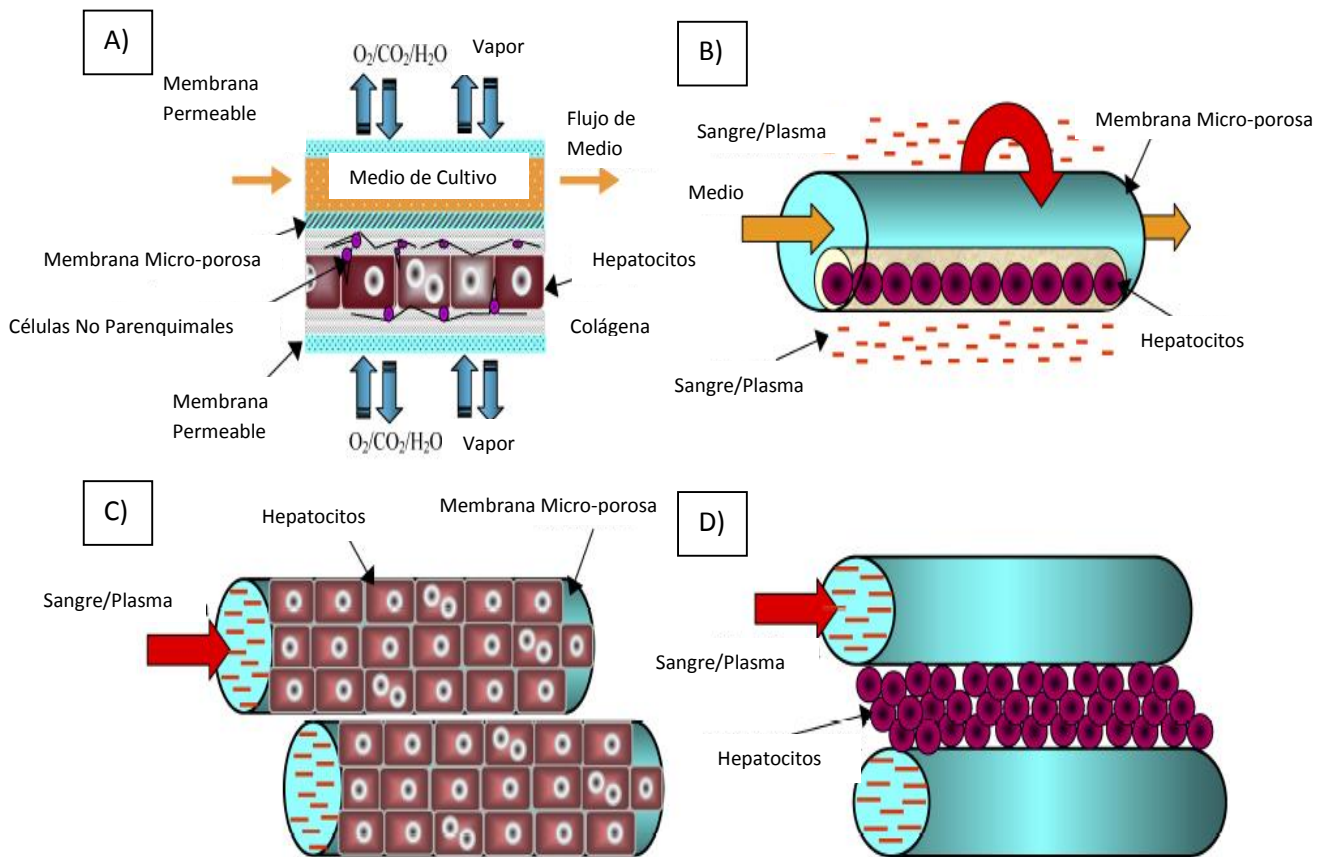


Figura 23. Esquemas de los tipos de cultivo de hepatocitos más empleados en los hígados bioartificiales, A) cultivo primario bidimensional de tejido hepático entre dos membranas micro porosas que permiten el paso de nutrientes del medio de cultivo y el intercambio gaseoso con la atmosfera B) hepatocitos en una matriz de colágena tridimensional con el flujo continuo de medio de cultivo, rodeado de una membrana porosa de filtrado que está en contacto directo con la sangre del paciente a procesar C) hepatocitos sembrados alrededor de las membranas porosas dentro de las cuales fluye la sangre a ser procesada D) esferoides de hepatocitos que están en suspensión junto a las fibras por las que fluye la sangre del paciente permitiendo el intercambio de nutrientes con los hepatocitos [38].

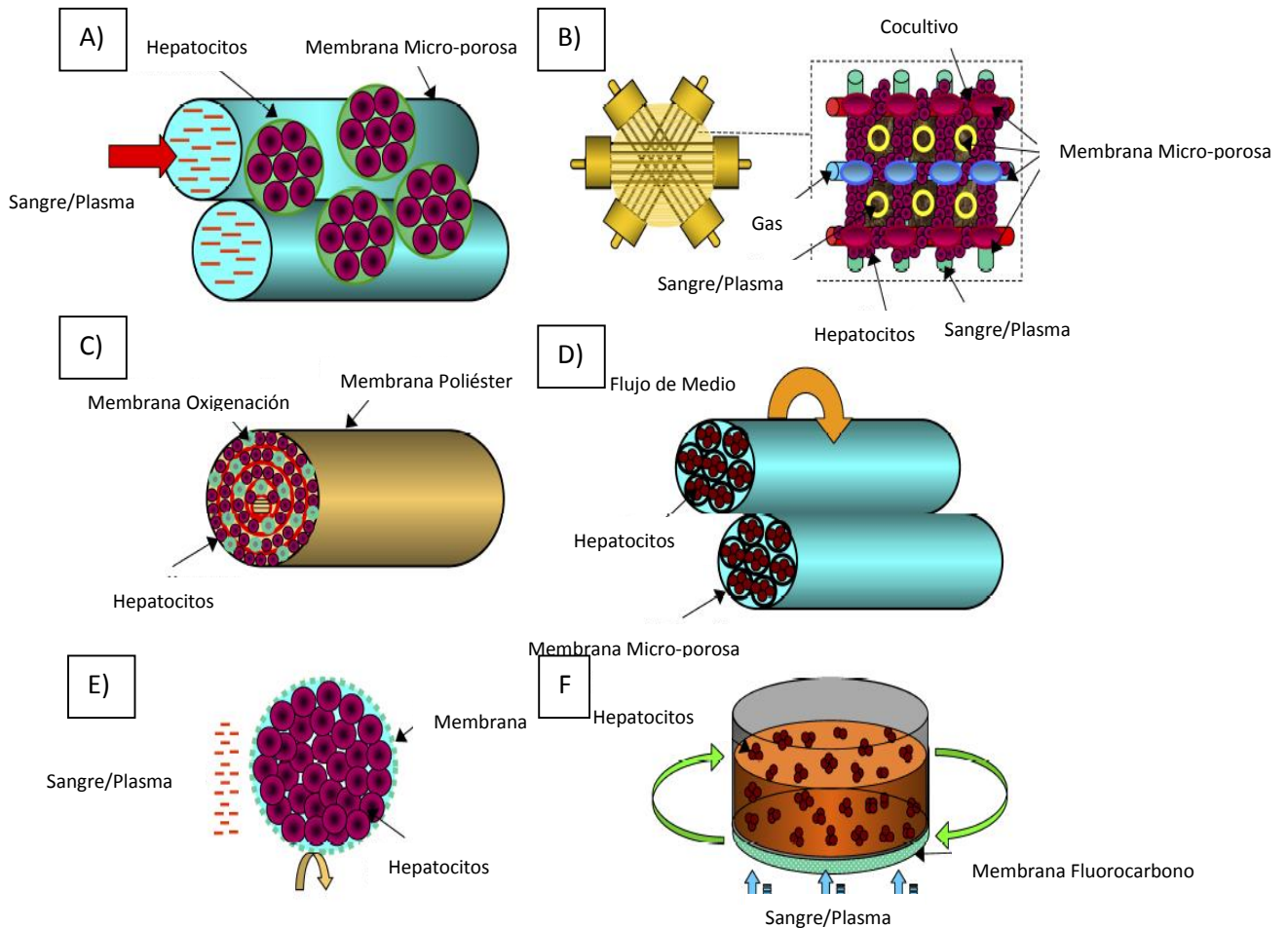


Figura 24. Esquemas de sembrado de hepatocitos más utilizados en los biorreactores para los hígados bioartificiales, A) encapsulados de hepatocitos adheridos a las membranas por las que circula la sangre a procesar, B) arreglo de capilares permeables en forma de red sobre los cuales son sembrados los hepatocitos y permitir un mayor flujo y contacto del plasma empleado dentro del biorreactor, C) rollo formado por la membrana porosa de celulosa con hepatocitos adheridos a la membrana y pequeños capilares que permiten la oxigenación del cultivo celular así como el flujo del plasma sanguíneo, D) capilares de celulosa que contienen hepatocitos en forma tubular que a su vez forman arreglos embebidos dentro de una membrana de celulosa por la cual en el exterior pasa tanto el medio de cultivo como la sangre a procesar, en E) y F) se muestran micro-encapsulados de hepatocitos en membranas permeables únicamente a gases los cuales pueden estar girando dentro del medio de cultivo o plasma sanguíneo a procesar [38].

Todos estos sistemas buscan optimizar las funciones fisiológicas hepáticas al utilizar materiales de soporte que permitan mantener la polaridad biológica de los hepatocitos así como reproducir un modelo del cocultivo hepático en su carácter de micro-filtrado para el intercambio de nutrientes y metabolitos [38].

A partir de los antecedentes descritos los hígados bioartificiales utilizados actualmente permiten brindar un soporte vital temporal que cumple con la mayoría de las funciones fisiológicas hepáticas en los pacientes con fallo hepático agudo o que esperan un trasplante, pero que creemos que se puede

potencializar la funcionalidad de los mismos utilizando biomateriales modificados en su superficie con polipirrol que funcionen como andamiaje tridimensional para un cocultivo de células endoteliales con hepatocitos, para generar un modelo de cocultivo hepático que potencialice las funciones de los hepatocitos aislados. Ya que al estar sobre un material que mejore las condiciones de anclaje y proliferación del cocultivo celular, se obtenga un incremento en el número de células y su funcionalidad en menor tiempo de cultivo, por lo que se podría tener cultivos celulares que puedan hacer más eficientes los hígados bioartificiales actuales.

Hipótesis

Si es posible generar un cocultivo de hepatocitos y células endoteliales en un andamio tridimensional modificado en su superficie dentro de un biorreactor de flujo radial, entonces podrá mejorarse la proliferación celular y su fisiología.

Objetivo General

Mejorar la proliferación y la función celular mediante las técnicas de cocultivo y el uso de un biorreactor de flujo radial a partir del cocultivo tridimensional de hepatocitos con células endoteliales en forma de capas sobre biomateriales modificados en su superficie.

Objetivos Particulares

- Generación de un cocultivo bidimensional con hepatocitos y células endoteliales.
- Generación de un cocultivo bidimensional con hepatocitos y células endoteliales sobre una superficie con polipirrol-iodo.
- Selección del andamio tridimensional y su modificación superficial con polipirrol-iodo para el cocultivo con hepatocitos y células endoteliales.
- Diseño y fabricación del biorreactor de flujo radial para el cocultivo con hepatocitos y células endoteliales.
- Proliferación de hepatocitos y células endoteliales con los andamios modificados en su superficie utilizando el biorreactor.
- Caracterización morfológica de las células dentro de los andamios.
- Medición de proteína total y albumina del cocultivo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos Celulares

Se utilizaron 2 líneas celulares para generar el cocultivo hepático; hepatocitos (HepG2) y células endoteliales (HUVEC).

Células HepG2

Los hepatocitos empleados fueron de la línea celular derivada de un hepatoblastoma humano HepG2 (ATCC HB8065) del pasaje 88 al 91; utilizando para su proliferación: medio de cultivo Williams Tipo E (Gibco 12551), suero fetal bovino (Gibco 16000) al 10 %, antibiótico y antimicótico (Gibco 15240) 100 M al 1 % y L-Glutamina (Sigma G-1517) 0,2 M al 1 %. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Corning). El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células se resembraron a una dilución de 1:2 una vez por semana, lavándose con tripsina-EDTA (Gibco 25200) al 0,25 %.

Células HUVEC

Las células endoteliales fueron de la línea celular HUVEC (ATCC CRL-1730) derivadas del cordón umbilical humano, del pasaje 7 al 11, utilizando medio de cultivo D-MEM (Gibco 12100-046), suero fetal bovino (Gibco 16000) al 10 %, Antibiótico y antimicótico (Gibco 15240) 100 M al 1 %, sal de heparina porcina intestinal al 0,1 mg/ml y Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) al 0,05 mg/ml. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Corning). El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células se resembraron a una dilución de 1:2 una vez por semana, lavándose con tripsina-EDTA (Gibco 25200) al 0,25 %. Las células fueron proliferadas en un ambiente controlado a 37° C y una mezcla de gases al 5 % de CO₂ y 95 % de aire en una incubadora de CO₂ con 90 % de humedad.

Superficies de Sembrado

Utilizamos diferentes tipos de superficies de sembrado dependiendo las necesidades específicas del desarrollo experimental; para comprobar la morfología y seleccionar el medio de cultivo complementado, utilizamos cubreobjetos (Corning) dentro de cajas Petri estériles de 35mm (Corning).

Los andamios que fueron utilizados para la experimentación tridimensional y dentro del Biorreactor, son de ácido L-Poliláctico (PLLA) (Concordia's standard BIOFELT BF 600), con una densidad de 25-100 mg/cc, y una porosidad del 90 % con un tamaño promedio de poro de 500 μm de diámetro.

Todos los materiales de sembrado control se compararon contra los materiales recubiertos con la técnica de polimerización por plasma agregando una capa delgada de polipirrol-iodo (Ppy-I), para observar las ventajas del recubrimiento.

Polimerización por plasma

La superficie de los materiales con Ppy-I se prepararon por polimerización por plasma con el siguiente protocolo: dentro del reactor de vacío se empleó una presión de $(9 \times 10^{-2}$ Torr) medida con un sensor de vacío tipo Pirani (Edwards Active Gauge Control). Se utilizó una potencia de 50 watts reales, obtenidos de una fuente de Radio frecuencia a 13,5 MHz (Dressler Cesar RF). Como monómeros empleamos Pirrol (98 % Sigma-Aldrich) e Iodo (98 % Sigma-Aldrich). Se polimerizó durante 20 minutos alternando 4 minutos con pirrol e Iodo, 6 minutos con pirrol, 4 minutos con pirrol e Iodo y finalmente 6 minutos con pirrol. [39]

Infrarrojo por transformada rápida de Fourier (FT-IR)

Para conocer los grupos funcionales que componen el Ppy-I se decidió realizar un análisis infrarrojo por transformada de Fourier, se elaboró una pastilla de Bromuro de potasio (KBr), el KBr fue colocado en un dado estándar para FT-IR y se aplicó una presión de 9 Tons/5 min. La pastilla fue colocada dentro del reactor de plasma durante la polimerización de los materiales. Una vez polimerizada se colocó en el lector FT-IR (Perkin Elmer). [40]

Diseño del Biorreactor

Para diseñar y modelar el biorreactor se utilizó el programa de diseño Solidworks (Dassault Systems SolidWorks Corp., México) y su toolbox Cosmos FlowWorks (Dassault Systems SolidWorks Corp., México). Con el que se obtuvieron las simulaciones del flujo dentro del biorreactor dibujado, y así poder optimizar el diseño a partir de los resultados de las líneas de flujo de cada simulación. El dibujo del biorreactor que se planteó finalmente se muestra en la Fig. 25.

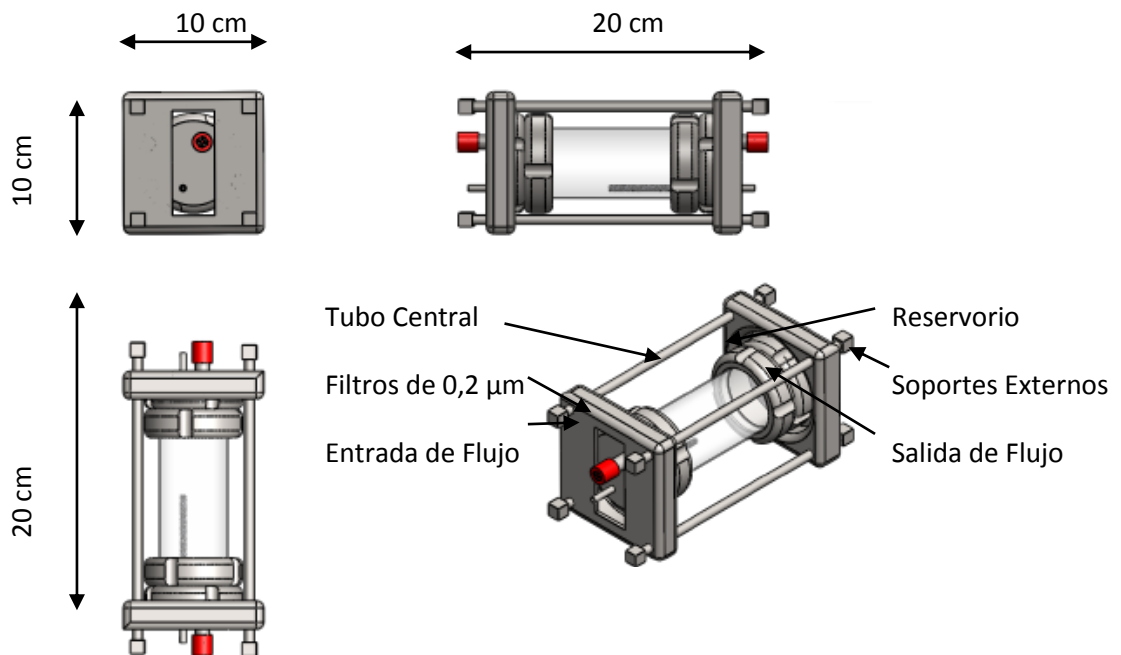


Figura 25. Plano Isométrico del Biorreactor de Flujo Radial en Sistema Europeo. Diseño final dibujado con el programa Solidworks con todas las partes armadas para simular y construir un biorreactor de flujo radial.

Para modelar los andamios dentro del biorreactor, se utilizaron las hojas de especificaciones de dichos materiales, se generaron cuerpos esponjosos, que cumplieran con el tamaño promedio del poro, la densidad del material y la geometría del andamio.

Los cálculos para el análisis de fluidos se realizaron a través de las líneas de flujo resultantes de la simulación. El tamaño de la celda se escogió a partir del área más pequeña por donde va a pasar el fluido, en este caso utilizamos un mallado de 50 μm debido a que tenemos un tamaño de poro de 500 μm de diámetro. Con 50 μm se obtuvo una buena resolución espacial sin aumentar demasiado los tiempos de computo de nuestra simulación.

Maquinado de Piezas

Las piezas metálicas del biorreactor fueron elaboradas de acuerdo a la norma internacional NSF/ANSI 51 que establece que el acero inoxidable usado en equipo biomédico y alimenticio debe ser de los tipos AISI 200, 300 ó 400, incluyendo aleaciones de estas series o sus anteriores, por lo que decidimos utilizar acero 304 grado alimenticio, libre de trazas de materiales pesados (ver anexo 2). Para el vidrio se utilizó vidrio tipo PIREX, y para las partes plásticas se empleó poliuretano de grado alimenticio. Se utilizó una bomba peristáltica (GE-Healthcare Pump-P1) a 7 ml/min y una incubadora de CO₂ Lab-line de 6 pies cúbicos a 37 °C y 5 % de CO₂.

Las piezas metálicas fueron maquinadas en un centro de control numérico (CNC), para tener mayor exactitud en las dimensiones y limpieza en el trabajo (Figura 26). Se decidió utilizar elementos de grado alimenticio ya que el cuerpo del biorreactor está dentro de la incubadora de CO₂ y únicamente fuera de ella está la bomba peristáltica, que está conectada al biorreactor por mangueras de poliuretano pirogénicas que se introducen por pequeños orificios realizados al empaque de la puerta de la incubadora. La longitud de las mangueras fuera de la incubadora de CO₂ fue de 15 cm, mientras que dentro de la incubadora su longitud fue de 50 cm. Se empleó una mayor longitud dentro de la incubadora para que el medio de cultivo alcanzara los 37 °C antes de entrar al biorreactor. Al encender la bomba peristáltica el equilibrio térmico se obtenía dentro de la primera hora.

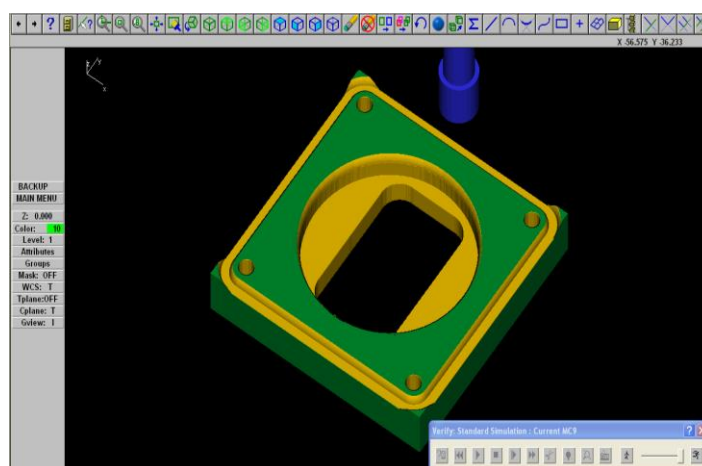


Figura 26. Maquinado de piezas utilizando el simulador “master cam”

Diseño Experimental

HepG2 y HUVEC en 2D con PPY-I

Se utilizó una densidad de sembrado de 5×10^5 de células HUVEC en 2,5 ml de medio (pasaje 6), y 5×10^5 de células HepG2 en 2,5 ml de medio (pasaje 85), las células fueron contadas con una cámara de Neubauer. Se realizó una mezcla de medios de cultivo Williams tipo E y D-MEM suplementados en una proporción 1:1 como se muestra en la Tabla 1. Se sembraron los Cocultivos en dos tipos de superficies por duplicado: en el primer caso se empleó un una caja Petri de 35 mm de diámetro por 10 mm de altura, con una superficie de sembrado de 8 cm² recubierto con polilisina (Corning #430165); en el otro experimento, se empleó un cubreobjetos de vidrio que fue polimerizado con polipirrol dopado con yodo (Ppy-I) que se encontraba estéril debido a que al ser polimerizado por plasma, el gas ionizado funciona como esterilizador; y antes

de sembrar el cocultivo, el cubreobjetos fue puesto durante 2 días debajo de luz ultravioleta, para tener una superficie estéril.

Soluciones	Concentraciones	Porcentaje (%)
Medio de cultivo Williams tipo E (Gibco 12551)	1x	44
D-MEM (Gibco 12100-046)	1x	44
10% suero fetal bovino (FBS) (Gibco 16000)	1x	10
1% de antibióticos (Gibco 15240)	100x	1
L-Glutamina (Sigma G-1517)	0,2 M	1
Sal de heparina porcina intestinal	0,1mg/ml	
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	0,05 mg/ml	

Tabla 1 Medio complementado para el cocultivo de hepatocitos y células endoteliales.

Células HepG2 y HUVEC en 3D con Ppy-I

Una vez seleccionado el medio de cultivo y el material polimerizado decidimos cultivar las células en 3 dimensiones con los andamios de PLLA mencionados, de 5cm de largo por 2,5 de ancho por 0,5 cm de profundidad, se utilizó una densidad de sembrado de 1×10^6 de células HUVEC en 2,5 ml de medio (pasaje 7) y 1×10^6 de células HepG2 en 2,5 ml de medio (pasaje 86). Se utilizó la mezcla de medio de cultivo que se muestra en la Tabla 1. Se sembraron los Cocultivos en dos tipos de superficies por duplicado, en el primer caso se empleó una esponjada de PLLA control y en el otro experimento, se empleó la esponja polimerizada con polipirrol dopado con yodo (Ppy-I). Se sembraron las células con una distribución uniforme como se muestra en el diagrama siguiente (Figura 27).

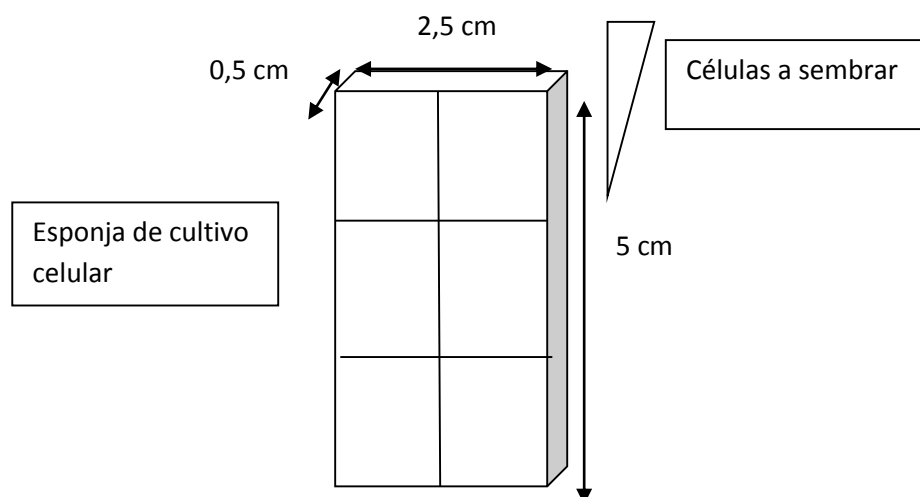


Figura 27. Sembrado de células. Se procuró seguir con la pipeta este trazado en ambos materiales para distribuir las células de manera homogénea en las 6 divisiones imaginarias para después cortar la esponja de manera similar y poder contar y fotografiar a las células.

Células HepG2 en biorreactor

Se realizó la comparación de cultivos volumétricos, utilizando el biorreactor con flujo radial contra un cultivo tridimensional dentro del biorreactor sin utilizar la bomba peristáltica. Se utilizó 1×10^6 células HepG2 de pasaje 89 en 2,5 ml de medio. Se utilizó un andamio control y un andamio con Ppy-I de 5 cm de largo por 2,5 de ancho por 0,5 cm de profundidad. Con 80 ml de medio de cultivo combinado dentro de la incubadora de CO₂, donde al cabo de 15 días se cambió a un medio de cultivo sin suero fetal bovino durante 7 días, para poder efectuar las mediciones de albúmina y proteína en el sobrenadante.

Cocultivo en biorreactor

Finalmente se realizó la comparación de los cultivos del biorreactor con HepG2 contra los Cocultivos de HepG2 con células HUVEC utilizando ambos materiales y mediciones de albúmina. Se utilizó 8×10^5 células HepG2 de pasaje 89 en 2,5 ml de medio y 2×10^5 células HUVEC de pasaje 7 en 2,5 ml de medio. Se utilizó un andamio control y un andamio con Ppy-I de 5cm de largo por 2,5 de ancho por 0,5 cm de profundidad. Con 80 ml de medio de cultivo combinado dentro de la incubadora de CO₂, donde al cabo de 15 días se cambió a un medio de cultivo sin suero fetal bovino durante 7 días, para poder efectuar las mediciones de albúmina y proteína total en el sobrenadante.

Inmunocitoquímica

Las pruebas de inmunocitoquímica nos permitieron conocer la distribución celular en los andamios así como conocer la cercanía que presentan las células e identificarlas, esta técnica utiliza el principio de la inmunofluorescencia.

Las células fueron observadas con el microscopio confocal LSM 710 AxioObserver, Carl Zeiss. Las células de cada muestra fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 25 % por 10 min. Se permeabilizaron las membranas celulares con Triton al 0,1 % por 10 min. Las muestras fueron lavadas 3 veces con solución buffer de fosfatos (PBS). [41]

Para las células HUVEC se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo de ratón anti-vW humano (factor de coagulación viii) (Dako) en dilución 1:25 y como anticuerpo secundario, un anticuerpo de cabra anti-ratón, conjugado con peroxidasa en dilución 1:100.

Después se utilizó el reactivo de Hoestch (Sigma 861405) diluido al 1:500 para teñir los núcleos de todas las células y así identificar la localización de ambos tipos celulares en el cocultivo.

Pruebas fisiológicas

Se midió la producción de albúmina como prueba metabólica, mediante la técnica de ELISA al medir las concentraciones en el sobrenadante de los cultivos celulares. Se utilizó el kit AssayMax Human Albumin (EA2201-1), el cual se basa en la utilización de un anticuerpo específico para la albúmina humana, anclado a la base de una placa de 96 pozos, y una curva de calibración realizada por medio de albúmina biotinilada que entra en competencia con la albúmina estándar para calcular la concentración final de las muestras [42]. Se tomaron 0,5 ml de sobrenadante del biorreactor durante 7 días, y se procedió a medir las concentraciones de albumina por duplicado, en un detector multimodal de placas DTX 880 (Beckman Coulter).

Cuantificación de proteínas

Para determinar las proteínas totales en el sobrenadante, se utilizó el kit de análisis de proteína BCA (ácido bicínico) (Thermo Scientific 23225), que trabaja por medio de colorimetría, a 562 nanómetros de la longitud de onda. La curva estándar fue obtenida inicialmente usando albúmina sérica bovina (BSA) a diversas concentraciones proporcionadas por el kit [42]. Se tomaron 0,5 ml de sobrenadante de las cajas Petri a diferentes días, las muestras fueron puestas en una placa de 96 pozos y se procedió a medir las concentraciones de proteína total por duplicado, en un detector multimodal de placas DTX 880 (Beckman Coulter).

Análisis de datos

Los datos se presentan como la media \pm SE de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se utilizó el software Origin versión 8.1 para la estadística significativa. La comparación entre los grupos se realizó mediante ANOVA. El método de Tukey fue utilizada para comparaciones múltiples. Una $P \leq 0,05$ fue considerada como estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del espectro de FT-IR

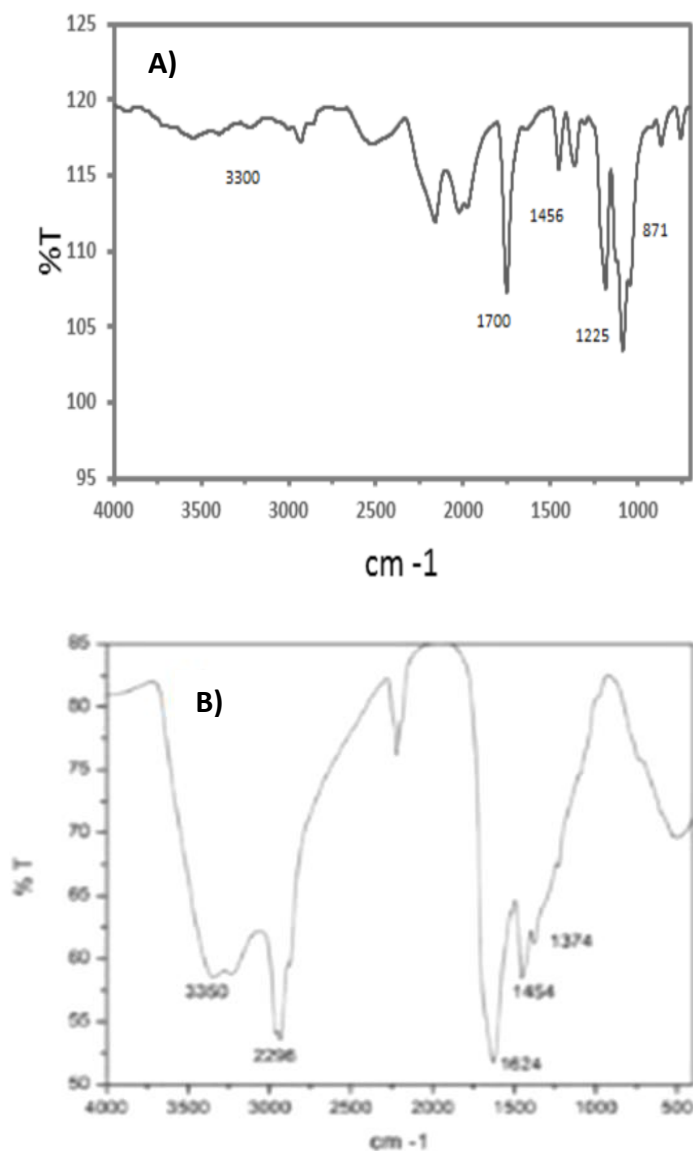


Figura 28. A) Espectro de transmisión por FT-IR del andamio de PLLA, B) Espectro de transmisión por FT-IR del andamio de PLLA con Ppy-I.

La Fig. 28 muestra en A) el análisis de transmisión por FT-IR (ATR) del espectro para el andamio de PLLA donde muestra picos de OH en 3300 cm^{-1} , grupos carbonilo a 1700 cm^{-1} , grupos metilo a 1456 cm^{-1} , y los enlaces C-O aparecen en 1225 cm^{-1} en 871 cm^{-1} aparecen los grupos C-C. En B) Todos los picos característicos del Ppy-I se pueden observar. Los picos en 3357 cm^{-1} y 1627 cm^{-1} corresponden a los grupos aminos en la estructura del Ppy-I. El pico ancho en el rango de $500\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ contiene muchas absorciones correspondiente a alcanos de la ruptura de los anillos de pirrol durante la polimerización. La anchura de los picos indica la compleja absorción en el

polímero debido al entrecruzamiento, enlazamiento e interacciones entre los grupos del pirrol [43].

Prueba de Medio de cultivo

Se decidió utilizar una mezcla de medios de cultivo, debido a que los medios de cultivo específicos para hepatocitos y células endoteliales no son funcionales para otro tipo celular, ya que afectaban su proliferación y morfología celular [44]. Las proporciones más adecuadas en base a los resultados obtenidos se muestran en la sección de metodología.

En la primera caja de Petri, se sembraron células HepG2 utilizando medio de cultivo tradicional, para tener un control de crecimiento. En la segunda caja de cultivo, se sembraron los hepatocitos, utilizando una mezcla 1:1 de los medios de cultivo Williams E y D-MEM como se muestra en la figura 29:

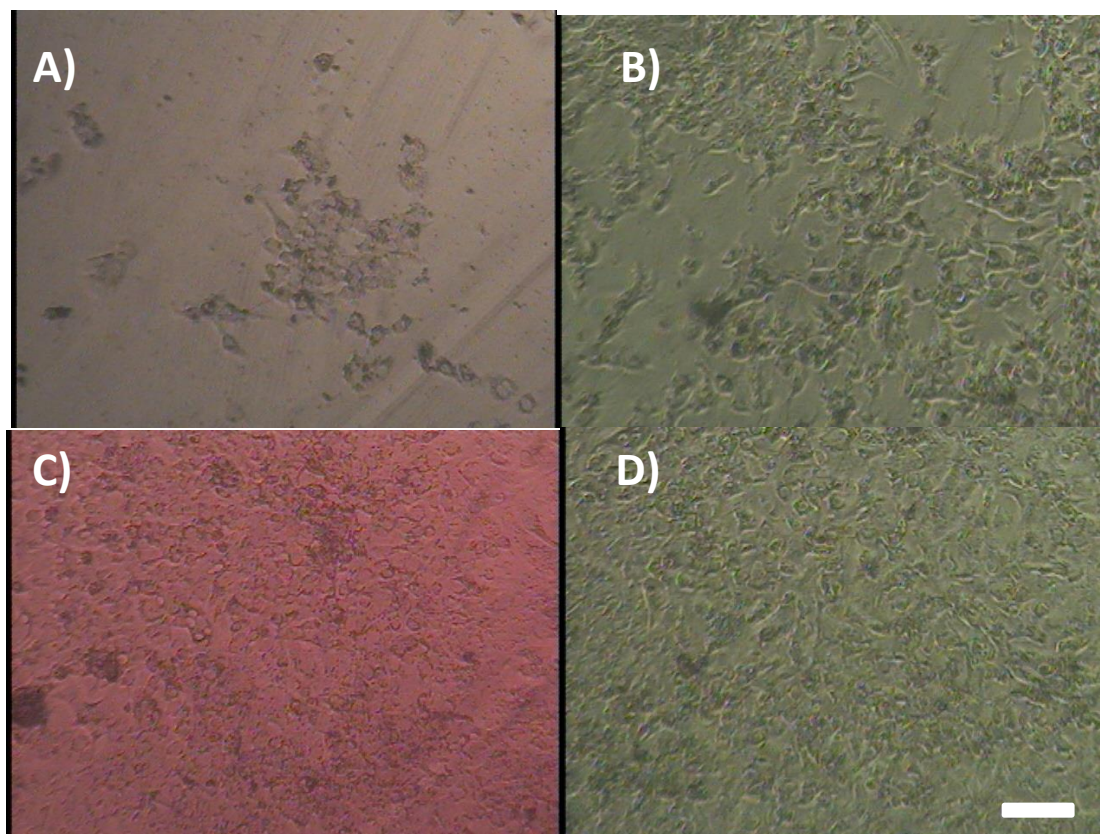


Figura 29. Células HepG2 en A) Día 5 de cultivo con medio tradicional. En B) Día 8 de cultivo con medio tradicional, C) Día 5 de cultivo con medio combinado, D) Día 8 de cultivo con medio combinado (Contraste de Fases, 100x, barra 100 μ m).

En la Figura 29 se pueden observar las imágenes para comparar la densidad celular a los de 5 y 8 días de cultivo. En A) se observa una baja densidad celular en medio tradicional, en comparación con C) en donde la densidad celular es mayor al utilizar el medio de cultivo combinado. Después de 8 días de cultivo, se puede observar que la confluencia celular sigue siendo baja en el

medio tradicional (B), y que en el medio combinado la densidad celular sigue siendo mayor (D).

Al cabo de 8 días de cultivo se comprobó que utilizando el medio de cultivo combinado (Williams y D-MEM) (1:1), se obtuvo una confluencia más rápida de las células sembradas en la caja de 35 mm por parte de las células hepáticas, en contraparte con la muestra control donde fue más lenta y llegando sólo al 70 % de confluencia, como se reportó en las imágenes anteriores. Se observó que desde el quinto día de cultivo en la caja con el medio combinado se comenzaron a formar cúmulos de células en la superficie de cultivo, para corroborar estos datos más adelante se muestran las tablas de producción de proteína en el sobrenadante de los cultivos celulares.

Células HepG2 en cubreobjetos con Ppy-I y medio combinado

En el siguiente experimento se sembraron células HepG2 sobre un cubreobjetos con Ppy-I, como se muestra en la Figura 30:

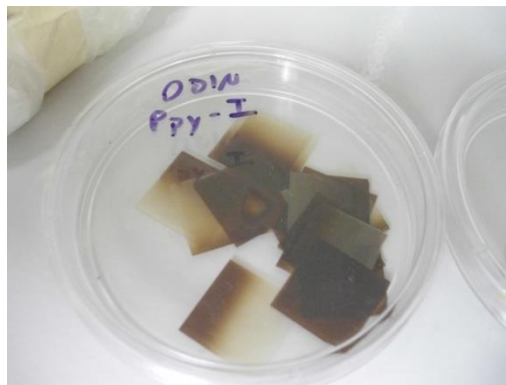


Figura 30. Imagen del cubreobjetos polimerizado.

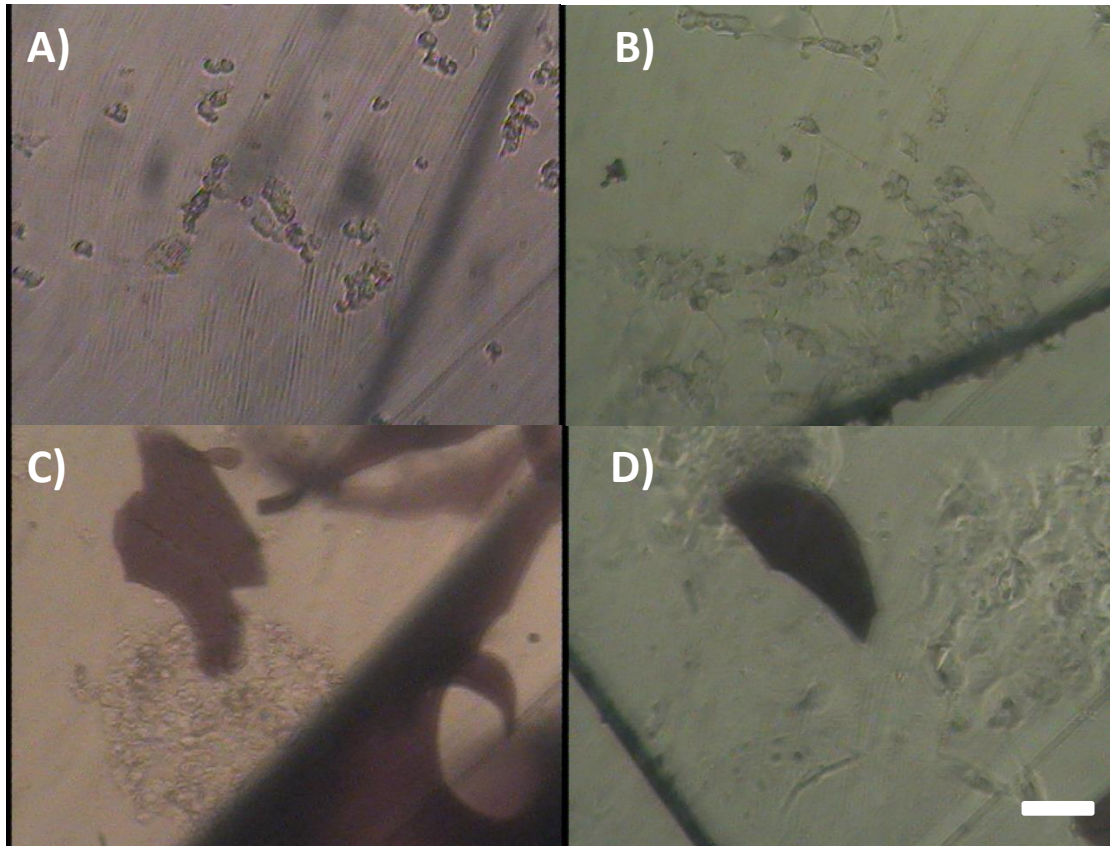


Figura 31. Células HepG2 en A) Día 5 de cultivo sobre un cubreobjetos, B) Día 8 de cultivo sobre un cubreobjetos C) Día 5 de cultivo sobre un cubreobjetos con Ppy-I, D) Día 8 de cultivo sobre un cubreobjetos con Ppy-I (Contraste de Fases, 100x, barra 100 μ m).

En la Figura 31 se observa el crecimiento de células HepG2 sobre un cubreobjetos polimerizado, en A) y B) se observa el crecimiento a los 5 y 8 días de cultivo respectivamente, en donde se pueden ver células adheridas sobre la superficie de los cubreobjetos sin recubrimiento superficial. En C) y D) se presentan imágenes de las células adheridas a los 5 y 8 días de cultivo, sobre la superficie de los materiales polimerizados, se observa la formación de cúmulos celulares, similares a los formados en los materiales sin recubrir.

En este experimento se puede observar que los cubreobjetos modificados con la mezcla de poli pirrol dopado con iodo, permiten una buena adherencia celular y proliferación de las mismas, sin que se presenten cambios morfológicos. Además de que al usar el medio de cultivo combinado no afecto su morfología, ni la proliferación celular.

Una complicación que se presentó, fue que al recibir el medio de cultivo, el recubrimiento superficial se quebró y desprendió de la superficie del cubreobjetos, debido a que tenía más de un mes almacenado, por lo que al quebrarse la superficie, se desprendieron partes del pirrol dopado, pero esto no fue impedimento para la proliferación celular, ya que como se muestra en las micrografías del día 8 de cultivo, las células crecieron, tanto en las partes sueltas del material como en el cubreobjetos con Ppy-I.

Células HepG2 en PLLA con Ppy-I y medio combinado

Para este experimento se utilizaron células HepG2 sobre una esponja de Acido L-Poli láctico tratada con Ppy-I, Figura 32:

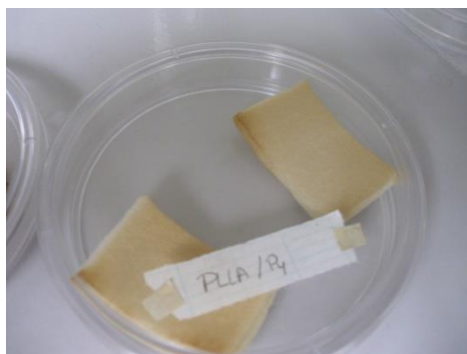


Figura 32. Imagen de las esponjas recubiertas con Ppy-I.

En la Figura 33 se muestra el cultivo de células HepG2 crecidas en PLLA y PLLA-Ppy-I. Las imágenes muestran la evolución del cultivo con respecto al tiempo, tomándose imágenes a los 5, 8 y 15 días de cultivo. En A), B) y C) se observan imágenes de los cultivos, en esponjas de PLLA, en A) se observan células creciendo en la superficie del plato de cultivo, y que posteriormente se adhieren y tienden a formar pequeños cúmulos sobre las fibras, como se muestra en B), siendo más notoria la formación y crecimiento de cúmulos celulares a los 15 días de cultivo (C).

En D), E) y F) se muestran imágenes de células en esponjas de PLLA con Ppy-I, se puede observar que a partir del día 5 de cultivo, se empieza a ver la formación de cúmulos celulares (D), que tienden a aumentar de tamaño conforme aumenta el tiempo de cultivo (E), F)

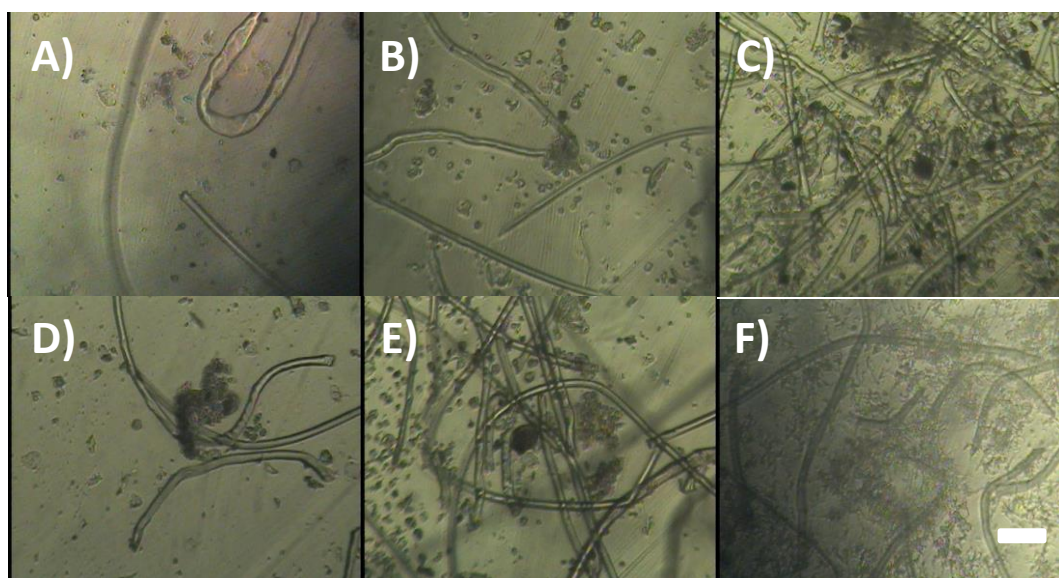


Figura 33. Células HepG2 en A) Día 5 de cultivo en una esponja de PLLA, B) Día 8 de cultivo en una esponja de PLLA, C) Día 15 de cultivo en una esponja de PLLA, D) Día 5 de cultivo en una esponja de PLLA con Ppy-I, E) Día 8 de cultivo en una esponja de PLLA con Ppy-I, F) Día 15 de cultivo

en una esponja de PLLA con Ppy-I (Contraste de Fases, 100x, barra 100µm).

Las esponjas de ácido poliláctico recubiertas con poli pirrol e iodo, mostraron un crecimiento y adherencia celular muy bueno como se puede apreciar en las imágenes anteriores, el único momento que presento dificultad fue al momento en que se adhirieron al material, ya que solo hasta el día 6 tuvieron buena adherencia.

Con estos cambios realizados, se obtuvo una muy buena propagación y adherencia de las células a los andamios teniendo los resultados mostrados en las imágenes.

El experimento se concluyó a los 22 días de cultivo, debido a que la esponja comenzó a perder consistencia y no mostraba una textura sólida, sino que mostraba una desintegración gradual que si permitía la proliferación celular pero perdió su consistencia original.

Experimentos células HUVEC

En este experimento se comparó el crecimiento celular de la línea celular HUVEC, utilizando el medio de cultivo combinado.

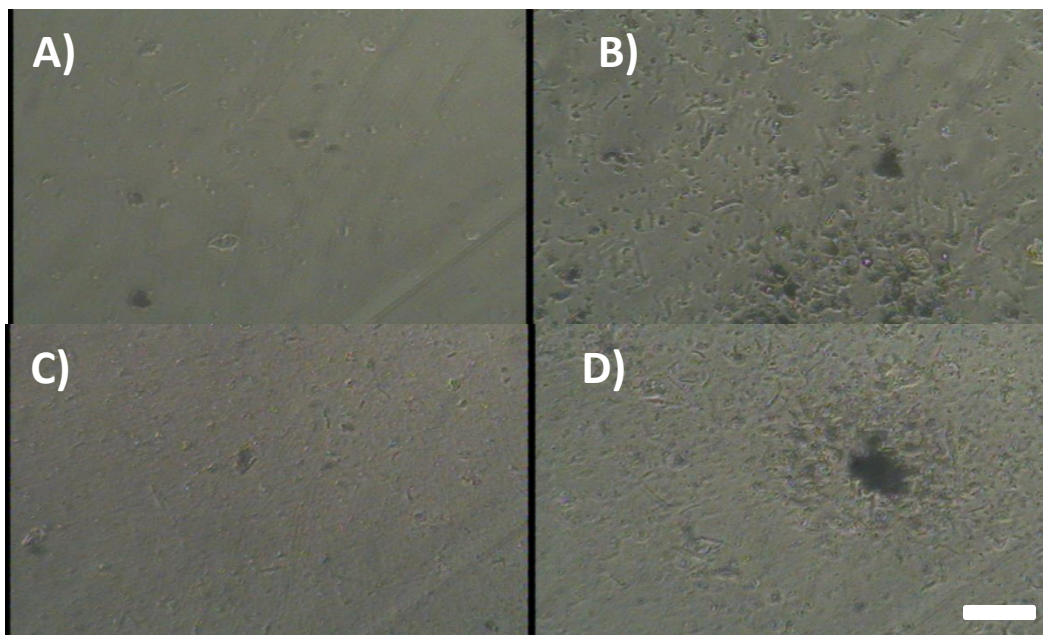


Figura 34. Células HUVEC en A) Día 5 de cultivo con medio tradicional. B) Día 8 de cultivo con medio tradicional, C) Día 5 de cultivo con medio combinado, D) Día 8 de cultivo con medio combinado (Contraste de Fases, 100x, barra 100 µm).

En la Figura 34 se muestra el crecimiento de las células HUVEC, observándose como en las células HepG2, el medio de cultivo combinado permite tener una

mejor proliferación de las células HUVEC C), D), al ser comparados con el medio tradicional A), B), esto se puede apreciar al comparar las fotos.

Podemos inferir que, los cultivos responden mejor, debido a que las células HepG2 crecidas en su medio de cultivo tradicional Williams tipo E, no contienen tan alto porcentaje de suero fetal bovino (SFB), en comparación con el medio D-MEM de cultivo de las células HUVEC. El medio que se utiliza para las células HUVEC, no aporta tantos nutrientes a las células como el medio de cultivo de las células HepG2, por lo que al combinarlos se optimizan los medios de cultivo y les favorece a las células en cuestión y sin alterar la morfología de las mismas.

Células HUVEC en cubreobjetos con Ppy-I y medio combinado

En el siguiente experimento se sembraron células HUVEC sobre un cubreobjetos con Ppy-I, como se muestra en la figura 35:



Figura 35. Cubreobjetos recubierto con poli pirrol iodo

La Figura 36 muestra el crecimiento de células HUVEC en cubreobjetos con y sin polimerizar. En A) y B) se observa el anclaje y crecimiento de las células sobre los materiales sin polimerizar a los 5 y 8 días de cultivo, en C) y D) se observa el anclaje y crecimiento de las células ahora sobre cubreobjetos polimerizados, se observa un comportamiento muy similar en ambos materiales.

Se observó que las células del tipo HUVEC, no se ven afectadas por la presencia del poli pirrol iodo en la superficie del cubreobjetos permitiendo a si una buena adherencia al material de cultivo sin que este interfiera en la proliferación ni la morfología de las células.

Al Utilizar el medio de cultivo combinado pudimos comprobar que no afecta la morfología celular en los materiales y que se puede comenzar un experimento de un cocultivo celular de hepatocitos y células endoteliales utilizando andamios con Ppy-I y el medio de cultivo combinado.

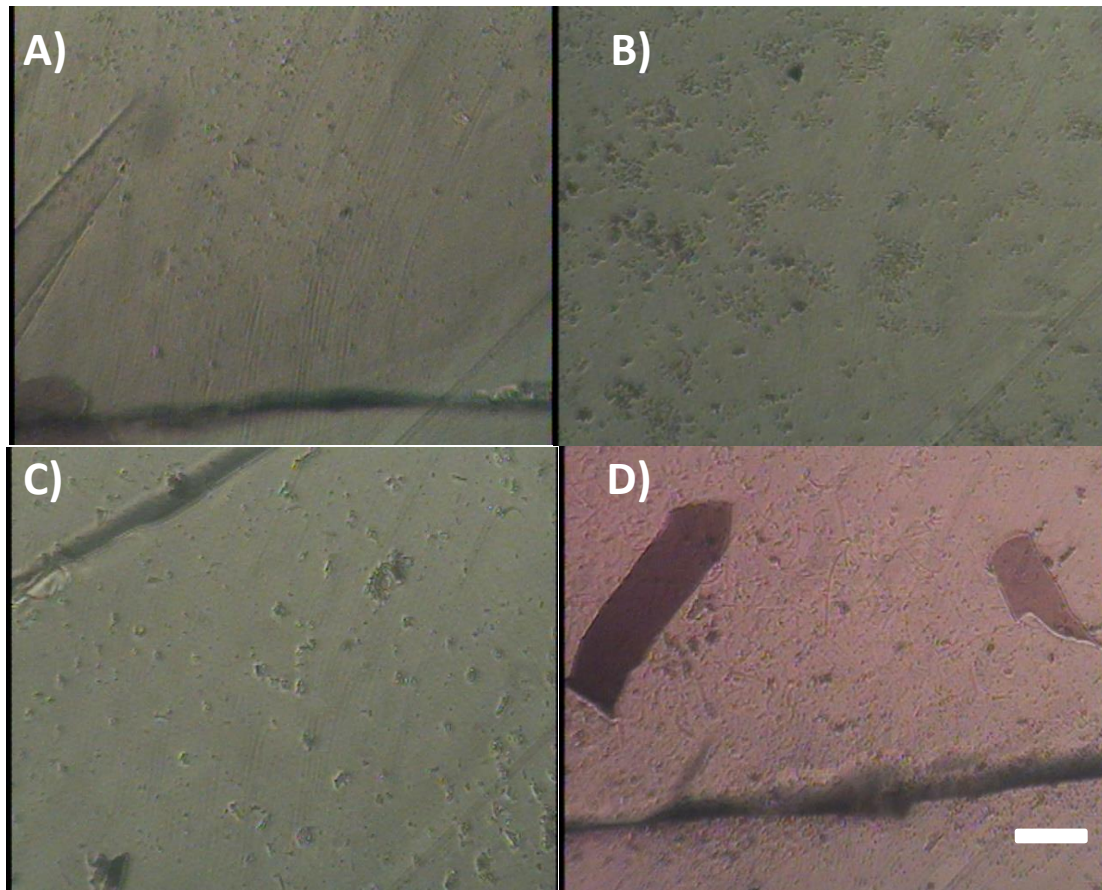


Figura 36. Celulas HUVEC en A) Día 5 de cultivo en cubreobjetos. B) Día 8 de cultivo en cubreobjetos, C) Día 5 de cultivo en cubreobjetos con Ppy-I D) Día 8 de cultivo en cubreobjetos con Ppy-I (Contraste de Fases, 100x, barra 100 μ m).

Células HUVEC en PLLA con Ppy-I en medio combinado

Se utilizaron células HUVEC sobre una esponja de Acido L-Poliláctico con Ppy-I, como se ve en la figura 37:



Figura 37. Esponja de Acido L-poliláctico modificada en su superficie

En la Figura 38 se muestran las imágenes del crecimiento en el tiempo de células HUVEC, A), B) y C) muestran las células en PLLA con 5, 8 y 15 días de cultivo, se observa a los 5 días de cultivo un bajo porcentaje de confluencia celular, pero se puede ver que las células se adhieren a la superficie de la fibra de PLLA, conforme avanza el tiempo la densidad celular aumenta como se

observa en C). En D), E) y F) se muestran células HUVEC en PLLA con Ppy-I con 5, 8 y 15 días de cultivo respectivamente, se observa una mayor proliferación celular en comparación con los andamios sin modificar, observándose una mayor cantidad de células ancladas a la superficie de las fibras. Como se muestra en las imágenes los andamios de PLLA recubiertos con polipirrol dopado con yodo, favorecen un crecimiento celular y proliferación de las células HUVEC, aunado a que proliferan de una manera más rápida al utilizar el medio de cultivo combinado. El experimento se concluyó a los 21 días de cultivo, debido a que la esponja comenzó a perder consistencia y no mostraba una textura sólida, sino que mostraba una desintegración gradual que si permitía la proliferación celular pero no tenía consistencia. Al adherirse al andamio tridimensional las células HUVEC comienzan a pegarse a la estructura y forman racimos de células tridimensionalmente. No pudimos llegar a comprobar la formación de capilares pero si pudimos concluir que el material de cultivo así como el medio de cultivo permiten obtener un cultivo celular tridimensional de células HUVEC.

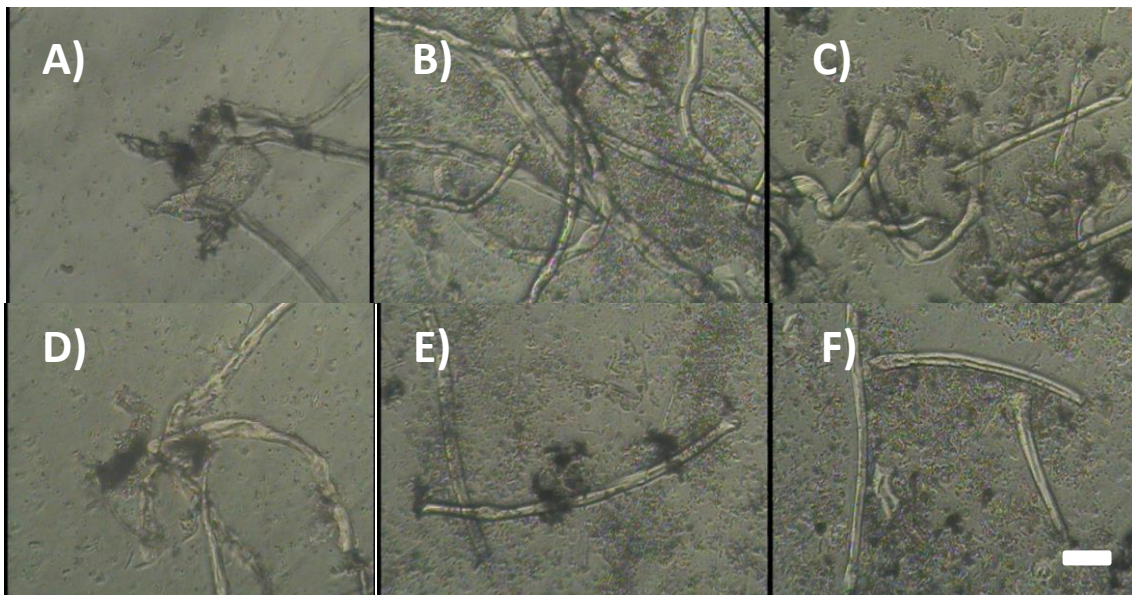


Figura 38. Cultivo de células HUVEC en esponja de PLLA a los 5, 8 y 15 días de cultivo como se muestra en A, B y C respectivamente y cultivo de células HUVEC en esponja de PLLA/Ppy-I a los 5, 8 y 15 días de cultivo como se muestra en D, E y F respectivamente (Contraste de Fases, 100x, barra 100 μ m).

Como podemos ver en la Figura 38, a partir del quinto día de cultivo las células comenzaron a adherirse a los andamios tridimensionales dando paso a la proliferación volumétrica de las células. Por lo que estas esponjas con este medio de cultivo serán las empleadas en los próximos experimentos de cocultivos tridimensionales, ya que tanto las células HepG2 como las HUVEC muestra una correcta adherencia celular y proliferación.

Las esponjas de PLLA/Ppy-I y el medio de cultivo combinado, fueron los utilizados en el biorreactor para obtener los cocultivos dentro de un ambiente controlado y que permita la generación de un cocultivo hepático tridimensional.

Cocultivo de células HepG2 y células HUVEC

Para este experimento se utilizaron células HUVEC y células HepG2, que fueron sembradas en una caja de cultivo de 35 mm con el medio de cultivo combinado para comprobar su crecimiento en cooperación.

Las células se sembraron en la misma caja de cultivo de manera separada como se muestra en la Figura 39:

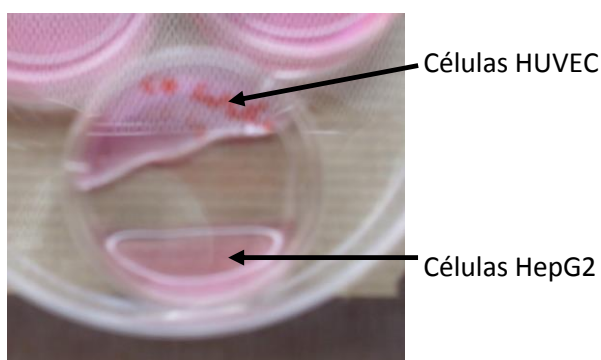


Figura 39. Sembrado de células HepG2 y HUVEC de manera separada para formar un cocultivo.

Al cabo de 4 horas desde el sembrado con la finalidad de que las células se adhieran se agregó a la caja de cultivo 4 ml del medio combinado, para cubrir la superficie del plato completamente, y darles oportunidad a las células de anclarse donde fueron sembradas, como se muestra en la Figura 40:

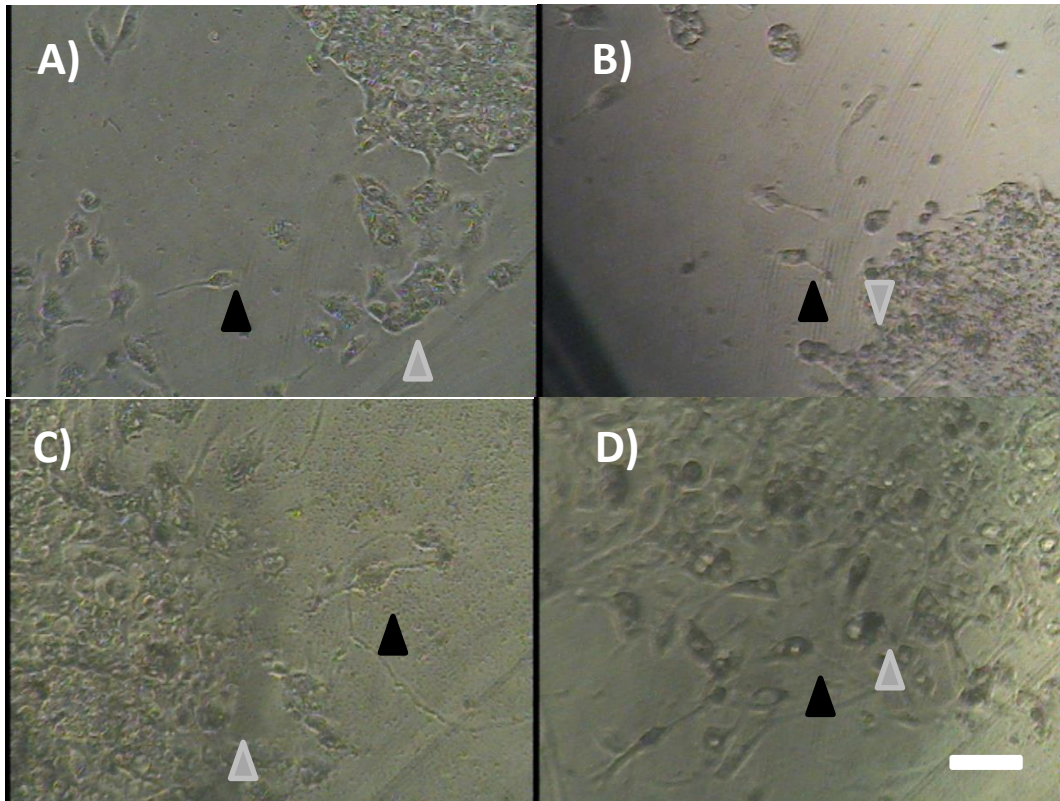
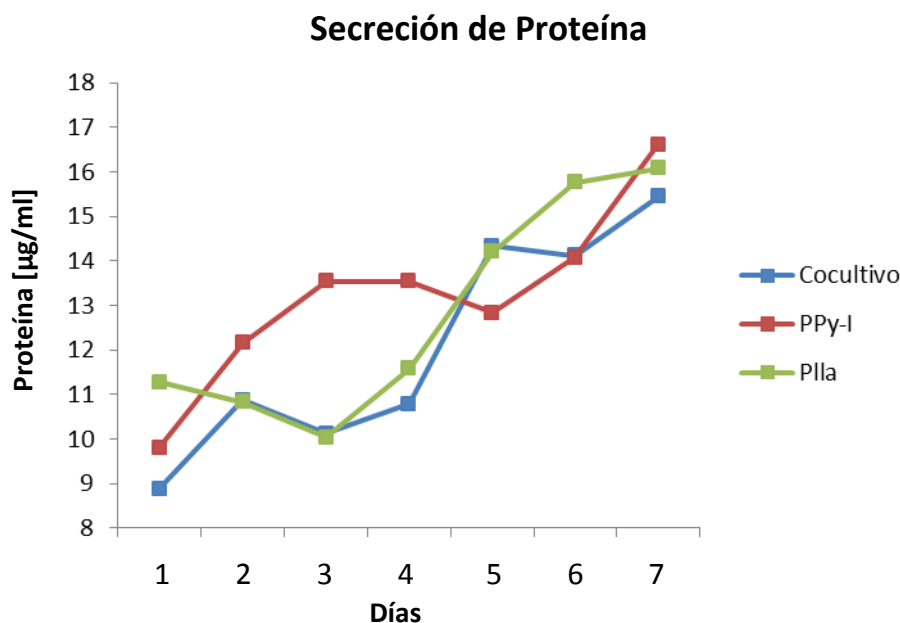


Figura 40. Cocultivo de células HepG2 (Triángulos grises) y HUVEC (Triángulos negros) sobre un cubreobjetos con Ppy-I, en A, B,C y D se muestra el cocultivo a los 7, 12, 19 y 21 días respectivamente (Contraste de Fases, 100x, barra 100 μ m).

En la Figura 40 observamos la evolución en el tiempo de los cocultivos celulares, se observa que a partir del día 7 (A) el crecimiento en conjunto de las células HepG2 y HUVEC, en donde se pueden distinguir por los triángulo gris y negro respectivamente, conforme avanza el tiempo, se observa que las células HepG2 tienden a tener una mayor proliferación que las células HUVEC, esto se observa en el día 12 (B), en los días 19 y 21 (C, D) las células HepG2 cubren gran parte de la superficies de los cubreobjetos polimerizados.

En estas últimas imágenes podemos observar como a los 21 días de cultivo, las células HUVEC han crecido alrededor de los cúmulos formados por las células HepG2 formando un cocultivo bidimensional. Este experimento sirvió para demostrar que las células pueden proliferar correctamente en un mismo medio de cultivo conservando su morfología. En las imágenes podemos observar como las células HepG2 comienzan a formar los cúmulos característicos de su proliferación, mientras las células HUVEC comienzan a envolver dichos cúmulos. Esto a pesar de que se sembraron de manera separada las células en gotas de un mililitro como se ve en la Figura 39, y sólo se les agregó medio de cultivo suficiente para llenar la caja de cultivo, cuando estuvieron bien ancladas las células, que fue el momento en que comenzaron a migrar y a comportarse de la manera descrita [44].

La Gráfica 1, muestra las comparaciones de proteínas totales en el sobrenadante, de los experimentos descritos de los cultivos celulares y las ventajas que aporta cada combinación realizada con los hepatocitos.



Gráfica 1. Secreción de proteína total en diferentes cultivos de células HepG2. En color azul para el cocultivo de células HUVEC y HepG2 en una caja estándar, en rojo para el cultivo sobre el cubreobjetos con Ppy-I y en verde para el cultivo sobre el andamio de PLLA con Ppy-I.

Por lo que podemos inferir que en los primeros días de cultivo el Ppy-I aumenta la producción de proteínas y es posible utilizar para un biorreactor cultivos celulares de estos primeros días para potencializar las funciones hepáticas de los pacientes que requieran del hígado bioartificial.

Diseño del biorreactor

La Figura 41 muestra los resultados de la simulación para el biorreactor de flujo radial (BFR), en A) se muestra una vista inferior del BFR, donde podemos observar las líneas de velocidad como líneas de colores que muestran un gradiente de velocidad de flujo dentro del soporte central. Una vez que el flujo líquido pasa a través del soporte de metal y el andamio, se obtiene una velocidad homogénea; este tipo de flujo ayuda a alimentar a las células por recambio del medio de cultivo en la vecindad inmediata a las células. (B) Imagen frontal del BFR que muestra un vórtice generado por la succión en la salida del biorreactor; esto asegura que no haya zonas estáticas en el BFR, y por lo tanto, se obtendría un buen intercambio del medio de cultivo; en esta imagen se utilizaron todas las líneas de velocidad para observar el comportamiento del sistema. (C) En una vista lateral del BFR, la simulación muestra la movilidad del líquido a través de todo el volumen del sistema, donde podemos observar que no existen zonas de medio de cultivo estático o flujo cero. El diseño final se obtuvo mediante el cambio de la velocidad del flujo de

entrada a la cámara hasta asegurar un intercambio continuo del medio de cultivo en la cámara.

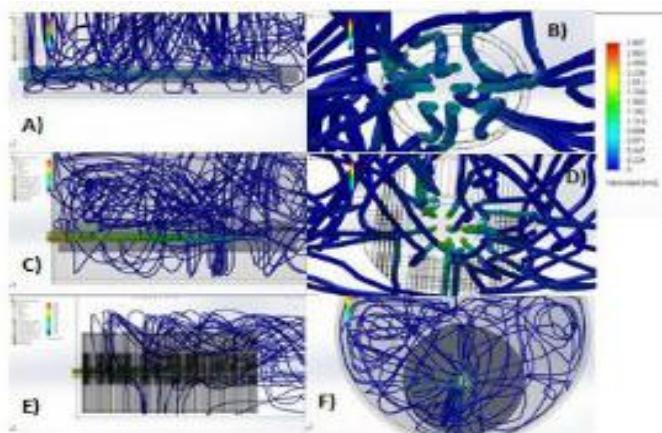


Figura 41. Líneas de flujo del campo de velocidad en código de colores, que indican los niveles de esfuerzos de corte utilizando diferentes grosores del andamio A, C y E muestra la vista lateral de 0,5 cm, 1,0 cm y 5 cm, respectivamente. B, D y F muestran la vista perpendicular al flujo y el flujo radial en los andamios.

Posteriormente se procedió a su construcción (Fig. 42). En base al diseño obtenido por los datos de la simulación. Las partes metálicas del biorreactor fueron maquinadas en un equipo de control numérico computarizado (CNC). Se utilizó acero de grado alimenticio (T-304).

El BFR estaba dentro de una incubadora de CO₂, y se conectaba a una bomba peristáltica por medio de mangueras de poliuretano que se insertaron a través de pequeños agujeros hechos en la junta de la puerta de la incubadora. La longitud de las mangueras fuera de la incubadora de CO₂ fue de 15 cm, mientras que dentro de la incubadora su longitud era de 50 cm. Una longitud más larga en el interior se utilizó para que el medio de cultivo que circula en la manguera se equilibre térmicamente a la temperatura de la incubadora (37 °C) antes de entrar en el biorreactor.



Figura 42. A) Biorreactor de flujo radial, B) biorreactor conectado a la bomba peristáltica con el medio de cultivo (80 ml), C) biorreactor con el andamio de PLLA con células HepG2, D) biorreactor dentro de la incubadora de CO₂ para poner a prueba el cultivo celular.

A continuación, se realizó el cultivo con células HepG2 utilizando el RFB, en el andamio de PLLA/Ppy-I, durante 15 días en una incubadora de CO₂. Para comparar los resultados, se realizó un cultivo de control con las mismas condiciones de cultivo solo que se mantuvo apagada la bomba peristáltica para tener un cultivo sin flujo.

Las Figuras 43 y 44 muestran imágenes obtenidas con microscopio óptico invertido y microscopía de barrido electrónico (SEM), de cultivos celulares de los experimentos sin flujo y con flujo del medio de cultivo respectivamente. En estas imágenes podemos ver a las fibras del andamio con las células adheridas a ellas, que se observan como pequeños polígonos regulares en las proximidades de las fibras. En la Figura 44 existe un mayor número de células que están cubriendo el andamio y están formando cúmulos de células, al ser comparadas con las imágenes de la Figura 43. En el caso de las imágenes de SEM se muestra la adhesión celular a los andamios y demuestran la mejor proliferación en el andamio modificado en su superficie.

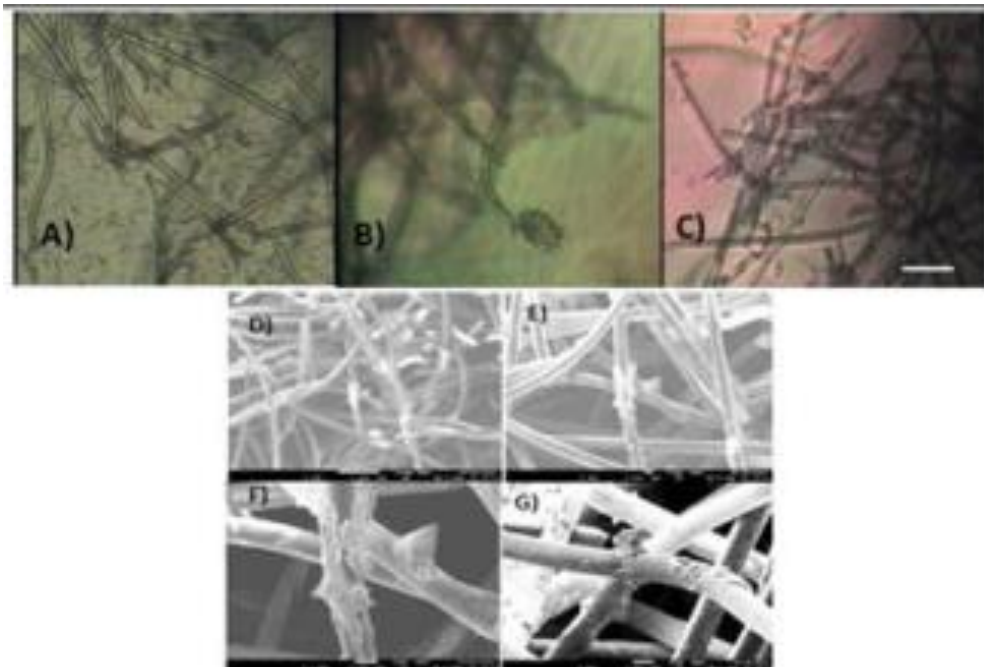


Figura 43. Imágenes del cocultivo celular tras 15 días de cultivo sin flujo dentro del biorreactor (A, B, C) (Contraste de Fases, 100x, barra 50 μ m), Imágenes de SEM de cultivo celular (D, E, F y G) (500x, barra 30 μ m).

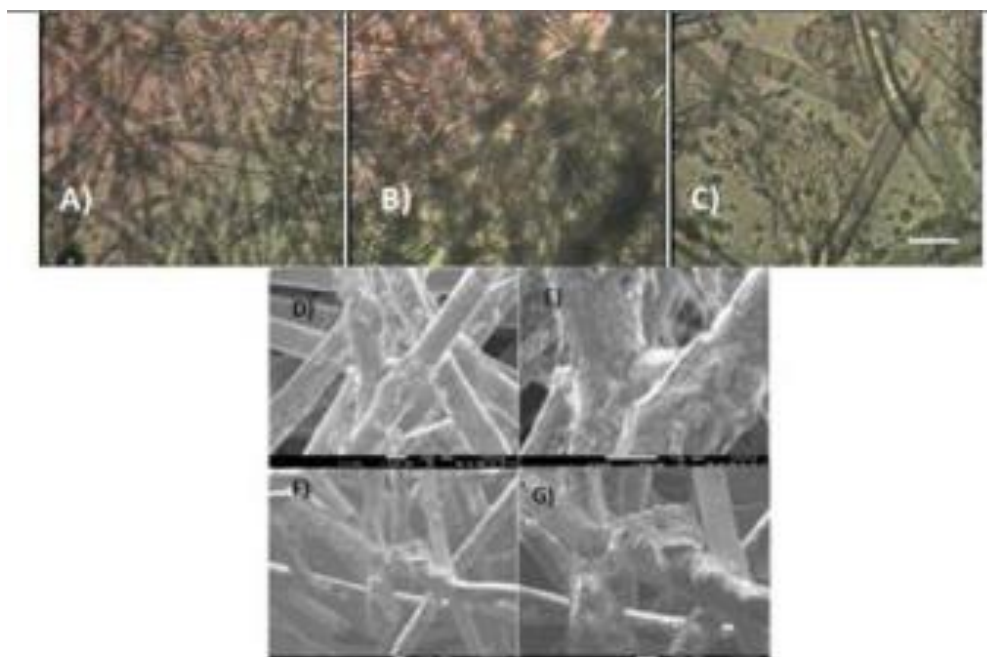


Figura 44. Imágenes del cultivo celular tras 15 días con un flujo de 7 ml / min de flujo (A, B, C), (Contraste de Fases, 100x, barra 50 μ m), Imágenes de SEM de cultivo celular (D, E, F y G) (500x, barra 30 μ m).

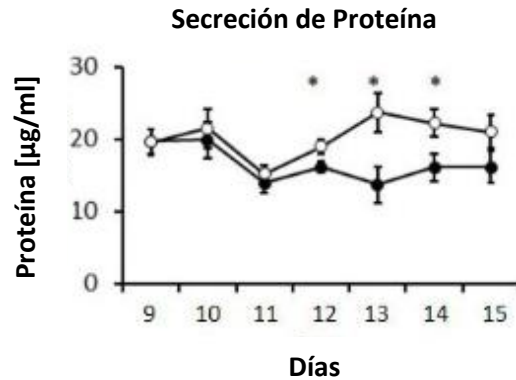
La Figura 44 muestra la distribución celular en el andamio con Ppy-I, que están formando cúmulos alrededor de la superficie de las fibras; esta distribución muestra una mejora de la proliferación celular al utilizar el BFR con el flujo aplicado; ya que la fisiología de los hepatocitos depende altamente de la distribución geométrica y el número de células [45]. En las imágenes de SEM las células se muestran en una lámina continua alrededor de las fibras, que indica una buena adherencia celular a las fibras, y una proliferación continua de las células. Es probable que la modificación en la superficie del andamio con Ppy-I, haya favorecido la adhesión celular como ya se ha descrito en otros trabajos [46].

Se confirmó lo observado en las imágenes anteriores contando las células de dichos experimentos mediante la cámara de Neubauer (Tabla 2). Las cantidades de células obtenidas fueron mayores en el BFR con el flujo en comparación con el biorreactor sin flujo. Se obtuvo aproximadamente el doble de células en comparación con el cultivo estático, El conteo final fue 5.38×10^5 células para el estático y 9.10×10^5 células ml en el BFR con flujo.

Tipo de cultivo	Células sembradas	Células cultivadas
Estático	1.33×10^5	5.38×10^5
Flujo Radial	1.33×10^5	9.10×10^5

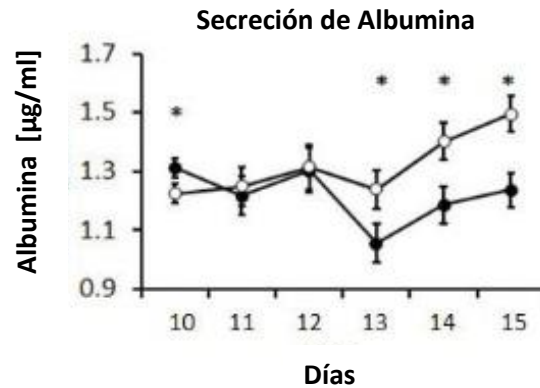
Tabla 2. Comparación de la densidad celular entre el BFR con flujo radial y con el medio estático luego de 15 días de cultivo.

Se cuantificó la producción de proteína total con y sin flujo de medio a diferentes días. Se detectó un aumento del 25% del contenido total de proteínas en los cultivos con flujo (22 $\mu\text{g} / \text{ml}$) respecto al cultivo sin flujo (16 $\mu\text{g} / \text{ml}$), al utilizar pruebas de ANOVA con la prueba de Tukey para medias ($p < 0,05$, $n = 3$) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Secreción de proteínas en diferentes días de cultivo. Cultivo estático (círculos negros) y cultivo con flujo (círculos blancos) * $p < 0,05$

Para confirmar este resultado también se midió la albúmina secretada, obteniéndose resultados similares, hubo un 25% más de contenido de albúmina en el cultivo con flujo (1,5 mg / ml) que en el cultivo estático (1,1 mg / ml) al realizar pruebas ANOVA con la prueba de Tukey para medias ($p < 0.05$, $n = 3$) (Gráfica 3).



Gráfica 3. Secreción de albúmina en diferentes días de cultivo. Cultivo estático (círculos negros) y cultivo con flujo radial (círculos blancos) * $p < 0,05$.

Las Gráficas 2 y 3 muestran una mayor secreción de proteína total, y un aumento en la función metabólica, cuando se utilizó el flujo continuo dentro del biorreactor en comparación con el cultivo sin flujo. Por lo que podemos inferir que el uso del biorreactor de flujo radial contribuye a la expresión de la función de las células HepG2.

Cocultivo de células HUVEC con HepG2 en biorreactor y andamio con Ppy-I

Finalmente se realizó el cocultivo de células HUVEC y HepG2, tomando en cuenta que el tiempo de duplicación para ambos tipos celulares es de 48 horas aproximadamente [48, 49]. Luego de 21 días de cultivo en el biorreactor, 15 días con el medio combinado y los últimos 7 días con el medio sin suero, se midió la densidad celular bajo las diferentes condiciones experimentales que se describen en la Tabla 3. El cultivo de HepG2 en los andamios recubiertos dentro del biorreactor de flujo radial, muestra una densidad mayor de células ($6,94 \times 10^6$) que en el andamio control ($4,88 \times 10^6$). La proliferación celular aumenta al realizar un cocultivo de HepG2 con HUVEC en un 61%, ya que se contaron $7,89 \times 10^6$ células para el andamio control y $8,03 \times 10^6$ para el andamio recubierto con Ppy-I.

Andamio	Tipo Celular	Células sembradas	Células cultivadas
PLLA	HepG2	1×10^5	$4,88 \times 10^6$
PLLA/Ppy-I	HepG2	1×10^5	$6,94 \times 10^6$
PLLA	HepG2/HUVEC	$0,8 \times 10^5 / 0,2 \times 10^5$	$7,89 \times 10^6$
PLLA/Ppy-I	HepG2/HUVEC	$0,8 \times 10^5 / 0,2 \times 10^5$	$8,03 \times 10^6$

Tabla 3 Comparación de la densidad celular entre cultivos y cocultivos hepáticos en el BFR luego de 21 días.

Las imágenes de la Figura 45 fueron tomadas con un microscopio confocal para distinguir las células teñidas con marcadores fluorescentes específicos, en este caso se tiñeron los núcleos celulares (color azul) de las células HepG2 para conocer su distribución exacta en los andamios. Como se muestra en la Figura 45 en A) donde se muestra el andamio de PLLA con HepG2, podemos observar grupos de células teñidas (azules) dispersas a través de la región. Una distribución uniforme de las células no es apreciable. Las células teñidas están presentes sólo en algunos lugares. (B) Muestra el andamio en campo claro, donde hay grupos de células dispersas por toda la región de las fibra. Las células teñidas están presentes sólo en algunos lugares. (C) Muestra el andamio de PLLA/Ppy-I y se observan cúmulos de células teñidas dispersas por la región. Se pueden observar más células teñidas, que están presentes y recorren el contorno de las fibras de los andamios de manera uniforme (D).

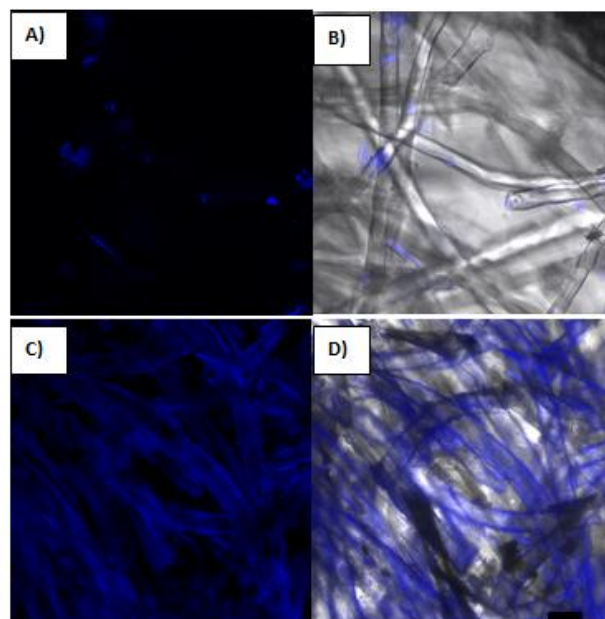


Figura 45 (A) Células HepG2 teñidas con Hoescht sobre andamios de PLLA, (B) Colocalización de imágenes de campo claro con tinciones celulares, (C) Células HepG2 teñidas con Hoescht sobre andamios de PLLA/Ppy-I, (D) Colocalización de imágenes de campo claro con tinciones celulares en andamios modificados. (Barra 20 micra, 200x)

Las imágenes de la Figura 46 fueron tomadas con un microscopio confocal para distinguir las células teñidas con marcadores fluorescentes específicos del núcleo celular (color azul) de las células HepG2 y las HUVEC indistintamente con la técnica de Hoescht, y la membrana celular de las células HUVEC (color rojo) con inmunofluorescencia; para conocer su distribución exacta en los andamios ya que cuando veamos la combinación de colores rojo y azul podemos reconocer a las células HUVEC en el cocultivo. Como se muestra en la Figura 46 en A) donde se muestra el andamio de PLLA con células HUVEC y HepG2, podemos observar grupos de células teñidos (azul) en la mayor parte de las fibras. Las células teñidas están presentes en casi todo el andamio. (B) Muestra en rojo la tinción de las membranas celulares de las células HUVEC únicamente sobre las fibras del andamio. (C) Muestra el andamio en campo claro, donde hay grupos de células dispersos por toda la región de las fibra. Las células teñidas pueden verse combinadas sobre el andamio celular con algunos pequeños cúmulos de células HepG2 sobre las fibras. (D) Muestra el andamio de PLLA/Ppy-I y se observan cúmulos de núcleos de células teñidas por la región entre las fibras y sobre las fibras. Los núcleos de las células HepG2 y HUVEC teñidos de azul están presentes y recorren la figura de los andamios de manera uniforme. (E) Muestra en rojo la tinción de las membranas celulares de las células HUVEC únicamente sobre las fibras del andamio, además de que se pueden observar los contornos de las fibras, (F) Muestra el andamio en campo claro, así como la localización de las células HepG2 y HUVEC por toda la región de las fibra. Las células teñidas pueden verse combinadas sobre el andamio celular además de formar un cúmulo muy grande de células HepG2 entre las fibras dándole una forma volumétrica.

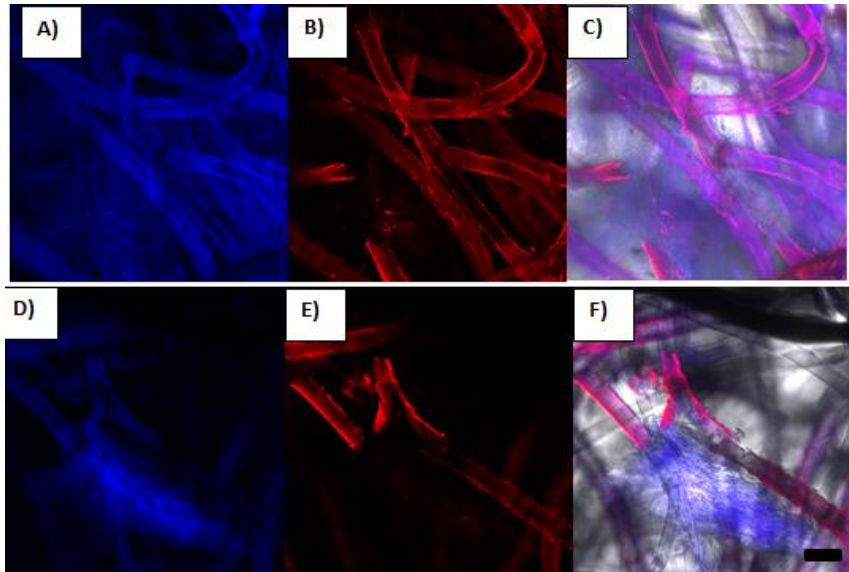
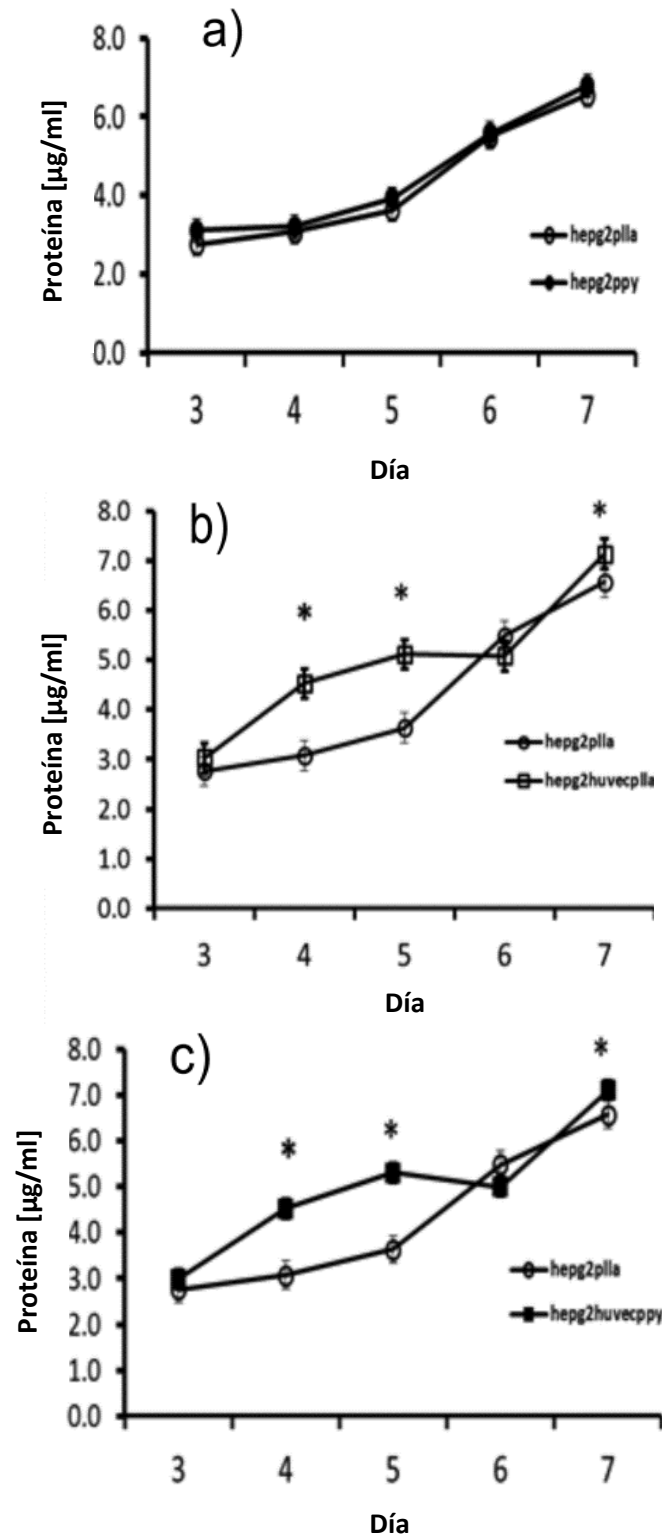


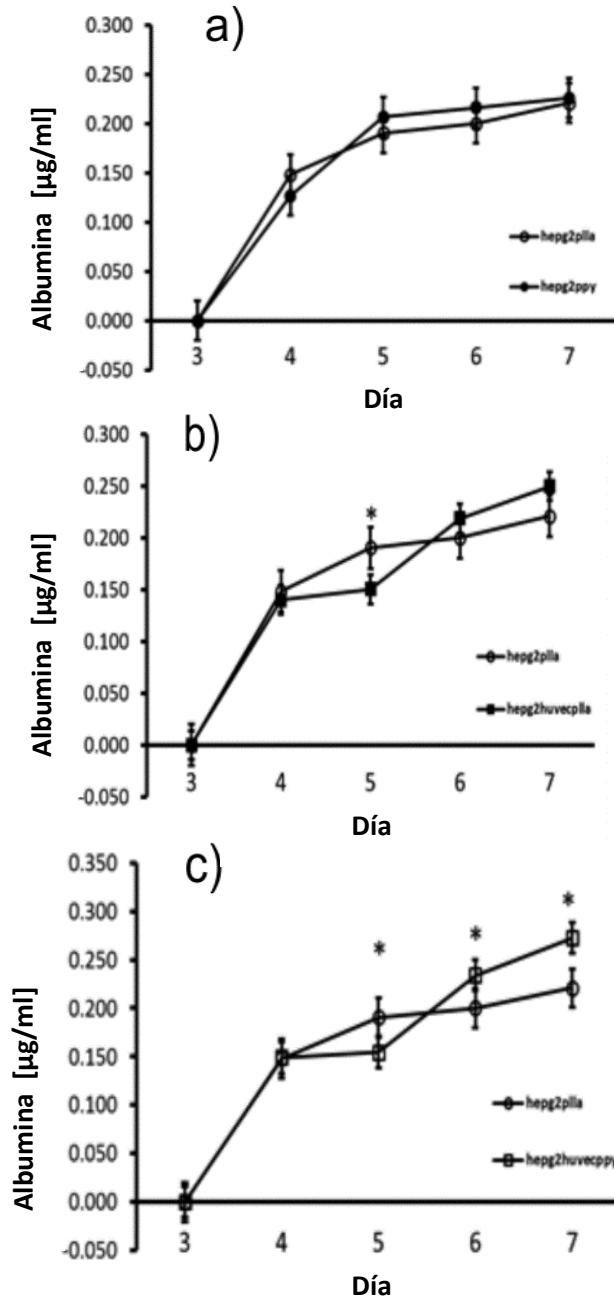
Figura 46 (A) Núcleos de células HepG2 y HUVEC teñidas de azul con Hoestsch sobre andamios de PLLA, (B) Inmunofluorescencia de anti-vW en células HUVEC sobre andamios de PLLA con tinción roja, (C) colocalización de imágenes A y B con la localización y diferenciación celular, (D) Núcleos de células HepG2 y HUVEC teñidas de azul con Hoestsch sobre andamios de PLLA/Ppy-I, (E) Inmunofluorescencia de anti-vW en células HUVEC sobre andamios de PLLA/Ppy-I con tinción roja, (F) colocalización de imágenes D y E con la localización y diferenciación celular. (Barra 20 micra, 200x)

Para comparar la actividad metabólica y la posible presencia de albúmina de suero humano, α -fetoproteína, fibronectina plasmática soluble, proteína de fase, proteína C-reactiva y varias otras globulinas secretadas por los hepatocitos aislados o en cocultivo con células HUVEC sobre los diferentes andamios [47], se midió la producción de proteínas totales secretadas al sobrenadante en los últimos 7 días, ya que fueron 21 días de cultivo en el biorreactor, 15 días con el medio combinado y los últimos 7 días con el medio sin suero para evitar interferencias con las proteínas presentes en el suero fetal bovino, nuestros resultados muestran un aumento en el contenido de proteína total siendo 6,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ en el andamio no recubierto y 7 $\mu\text{g} / \text{ml}$ en el andamio recubierto (Gráfica 4).



Gráfica 4. Contenido de proteína total con: a) cultivo de HepG2 sobre andamio de PLLA (círculos blancos) y cultivo de HepG2 sobre andamio de PLLA / Ppy-I (círculos negros), b) cultivo de HepG2 sobre andamio de PLLA (círculos blancos) y cultivo de HepG2/HUVEC sobre andamio de PLLA (cuadrados blancos), c) cultivo de HepG2 sobre andamio de PLLA (círculos blancos) y cultivo de HepG2/HUVEC sobre andamio de PLLA / Ppy-I (cuadrados negros) (* p < 0,05).

Para medir la actividad metabólica de los hepatocitos exclusivamente, se midió la albúmina del sobrenadante, ya que los resultados de la proteína total secretada fueron muy similares para los experimentos anteriores y decidimos medir una proteína exclusiva de la actividad fisiológica de los hepatocitos. Hubo un aumento de 40% de albúmina en el andamio de control (0,210 $\mu\text{g} / \text{ml}$) en comparación con el andamio híbrido (0,275 $\mu\text{g} / \text{ml}$) ($p < 0,05$, $n = 3$) (Gráfica 5).



Gráfica 5. Albúmina secretada en el medio de cultivo con: a) cultivo de HepG2 sobre andamio de PLLA (círculos blancos) y cultivo HepG2 sobre andamio de PLLA / Ppy-I (círculos negros), b) cultivo de HepG2 sobre andamio de PLLA (círculos blancos) y cultivo de HepG2 / HUVEC sobre andamio de PLLA (cuadrados negros), c) cultivo de HepG2 sobre andamio de PLLA (círculos blancos) y cultivo de HepG2 / HUVEC sobre andamio de PLLA/Ppy-I (cuadrados blancos) (* $p < 0,05$).

Conclusiones y perspectivas

A partir de los resultados obtenidos de la parte experimental podemos concluir que:

Se obtuvo un cultivo celular mixto de hepatocitos y células endoteliales sembradas sobre una caja de cultivo estándar y una superficie modificada con Ppy-I. Nuestras imágenes indican que la superficie tratada con Ppy-I no afecta la morfología de las células HepG2 y HUVEC. El conteo celular muestra resultados similares en ambas superficies, por lo que no se ve afectada la proliferación celular. Los datos indican que el Ppy-I incrementa la producción de proteína total, como se ha reportado en los trabajos publicados [25,39, 41,43, 44, 46]. No se observaron efectos tóxicos.

Se diseñó y construyó un biorreactor de flujo radial (BFR) para realizar crecimientos celulares tridimensionales volumétricos, con la flexibilidad de variar la cantidad de células a cultivar, la cantidad y tipo de material utilizado como andamio, sin la necesidad de variar las condiciones físicas del biorreactor.

Con el BFR se logró que el medio de cultivo llegue a todas las células con un flujo continuo, bajo esfuerzo de corte y mecánico, permitiendo un intercambio continuo de los nutrientes a través del andamio de un cultivo celular tridimensional. La simulación de las líneas de flujo dentro del biorreactor, permite predecir y optimizar el diseño del flujo de los medios de cultivo en el biorreactor, sin tener que realizar numerosas y costosas pruebas preliminares, ahorrando tiempo y recursos.

Los andamios modificados con polipirrol dopado con yodo podrían ser considerados como nuevos biomateriales, que pueden ser utilizados en la ingeniería de tejidos y biorreactores. En el andamio híbrido, la proliferación de los hepatocitos (HepG2) fue mayor y formaron cúmulos más grandes de células, comparadas con el andamio sembrado únicamente con células HepG2. Estos resultados indican que el PLLA/Ppy-I con células HUVEC puede ser un andamio prometedor para el desarrollo de métodos de cultivo funcionales con aplicación potencial en estudios farmacológicos, y futuro uso clínico en hígados bioartificiales.

La presencia de Ppy-I en un cocultivo de células HepG2 y HUVEC promueve la fisiología celular de los hepatocitos. Los modelos de hígados artificiales en la actualidad, emplean únicamente hepatocitos en lugar de emplear un modelo más complejo en cuanto a cooperación celular para mejorar su desempeño. Los cocultivos y superficies tratadas pueden mejorar significativamente el desempeño de los hepatocitos, por lo que se proponen estas modificaciones en

un sistema de andamios modificados en su superficie y condiciones de cultivo celular dentro de un biorreactor, aptas para mejorar el desempeño de un hígado bioartificial.

Se considera como trabajo a futuro, utilizar un andamio mejor estructurado para poder organizar el modelo hepático buscando un modelo de sinusoide funcional. Caracterizar, utilizando ecuaciones dinámicas, el biorreactor de flujo radial para que pueda ser utilizado en diferentes tipos celulares, no solamente hepáticas. Generar un modelo utilizando cultivos celulares primarios para poder avanzar en las pruebas *in vivo* en roedores. Mejorar el trabajo histológico para estudiar la organización estructural de las células sobre el andamio celular.

Bibliografía

- [1] Guyton A. C., Hall J. E. "Tratado de Fisiología Médica", Cap. 2 "La célula y sus funciones" Elsevier Edición 12 (2011) pp. 43-103
- [2] Dufour J.F., Clavien P.A., Trautwein C., Graf R. "Signaling Pathways in Liver Diseases" Cap. 1 "The Cell Types and the Matrix" Springer 2nd edition, (2010), pp 1-146.
- [3] Friedman L., Keefe E. "Handbook of liver diseases", Cap. 2 "Acute liver failure". Elsevier; 3ra. Edición, (2012) pp 20-35
- [4] Arias I., Alter H., Boyer J., "The liver biology and pathobiology", Cap. 2 "Embryonic development of the liver" Wiley-Blackwell 5ta Edición (2009), pp. 26-83.
- [5] Berenguer J., Parrilla P. "Trasplante Hepático" Cap. B "Transplante hepático en niños" Elsevier 2da. Edición (2008) pp 14-36.
- [6] Athanasakis E, Mouloudi E "Metastatic liver disease and fulminant hepatic failure: presentation of a case and review of the literature". European Journal of Gastroenterology Hepatology Vol. 15 (11) P. 1235-1240 (2003)
- [7] Bataller R., Brenner D. "Liver fibrosis" Journal of Clinical Investigation Vol. 115 (2) p. 209-218 (2005)
- [8] Herrerías J., Díaz A., "Tratado de Hepatología" Sección X "Deficiencia Hepática Crónica" Universidad de Sevilla 2da Edición (1996) pp. 705-804
- [9] Friedman, S.L. "Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury." Journal of Biological Chemistry Vol. 275 (4) p. 2247-2250 (2000)
- [10] Senties M., Gálvez F., Meza E., Armendáriz J. "Fibrosis Hepática, El papel de las metaloproteinasas y de TGF- β " Gaceta Médica Mexicana Vol. 141 (4) P. 315-322 (2005)
- [11] Base de datos. INEGI. Mujeres y Hombres en México. (2013)
- [12] Base de Datos del Instituto Nacional de Salud Pública (2013)
- [13] Chamuleau R. "Future of bioartificial liver support" World J Gastrointest Surg Vol. 1 (1) P. 21-25 (2009)
- [14] Cheng-Bo Y., Xiao-Ping P., Lan-Juan L., "Progress in bioreactors of bioartificial Livers" Hepatobiliary Pancreat Dis Int Vol 8(2) P. 134-140 (2009)
- [15] McKenzie T., Lillegard J., Nyberg S. "Artificial and Bioartificial Liver Support", Seminars in Liver Disease Vol. 28 (2) P. 210-217 (2008)

- [16] Vozzi F., Heinrich J., Bader A., Ahluwalia A. "Connected Culture of Murine Hepatocytes and HUVEC in a Multicompartmental Bioreactor" *TISSUE ENGINEERING: Part A* Vol. 15 (6) P. 1291-1299 (2008)
- [17] Alison P., McGuigan P., Sefton M. "Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion" *PNAS* Vol. 103(31) P. 11461-11466 (2006).
- [18] Wilkening F., Stahl F., Bader A. "Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line hepg2 with regard to their biotransformation properties" *Drug Metabolism and disposition* Vol. 31 (8) P. 1035-1042 (2003)
- [19] Saito M., Matsuura T., Masaki T., Maehashi H., Shimizu K., Suzuki T., Braet F. "Reconstruction of liver organoid using a bioreactor" *World Journal Gastroenterology* Vol. 12(12) P. 1881-1888 (2006).
- [20] Vander "Human Physiology: The Mechanism of Body Function", McGraw-Hill Companies Eighth Edition, (2001)
- [21] Anaya J.M., Shoenfeld S., Correa P. "Autoinmunidad y enfermedad autoinmune" Corporación para investigaciones biológicas, primera edición (2005)
- [22] Montuenga, L. "Técnicas en histología y biología celular" Elsevier (2009)
- [23] Krause P., Saghatolislam F., Probst I. "Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells" *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal* Vol. 45(5-6)P. 205-212 (2009)
- [24] Stevens M, George J "Exploring and engineering the cell surface interface." *Science* Vol. 310 (5751) P. 1135 - 1138 (2005.)
- [25] Ramírez-Fernández O. "Crecimiento volumétrico de hepatocitos sobre materiales modificados superficialmente" Tesis de maestría UAM Iztapalapa (2009)
- [26] Verma P., Verma V., Ray P., Ray A. "Formation and characterization of three dimensional human hepatocyte cell line spheroids on chitosan matrix for in vitro tissue engineering applications" *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal* Vol. 43 P. 328-337 (2007)
- [27] Chen Z., Gillies G., Fillmore H., Sholley. M., Broaddus W. "In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells" *Journal of Neurooncology* Vol. 92 (2) P. 121-128 (2009)
- [28] Thomas RJ, Bennett , Thomson , 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 P. 16-26 (2006)

- [29] Vacanti, C.A., Vacanti, J.P., Langer, R., "Tissue Engineering Using Syntetic Biodegradable Polymers, Polymers of Biological and Biomedical Significance", American Chemical Society, Washington, D.C. Vol. 540 P. 16-34 (1994).
- [30] 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)
- [31] Lampugnani G., Orsenigo F., Rudini N., Maddaluno L., Dejana E. "CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity" Journal of Cell Science Vol. 123 p. 1073-1080 (2010)
- [32] Chen Z., Htay A. Dos Santos , Gillies T., Helen L., Fillmore, Broaddus C. "In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells" Journal of Neuroncology Vol. 92 (2) P. 121-128 (2009)
- [33] Lee P., Hung P., Lee L. "An Artificial Liver Sinusoid With a Microfluidic Endothelial-Like Barrier for Primary Hepatocyte Culture" Biotechnology and bioengineering Vol. 97 (5) P. 1340-1346 (2007)
- [34]Chaudhuri J.B., Al-Rubeai M.(eds.) "Bioreactors for Tissue Engineering", Ed. Springer. (2005)
- [35] Eibl R., Eibl D., "Disposable Bioreactors" Springer 1era Edición(2009)
- [36] Kino-Oka M., Taya M. "Desing and Operation of a radial flow bioreactor for reconstruction of cultured tissues" Bioreactors for Tissue Engineering, Springer P. 115 - 133 (2005)
- [37] T. Iwahori, N. Matsuno, Y. Johjima, O. Konno, I. Akashi, Y. Nakamura, K. Hama, H. Iwamoto, M. Uchiyama, T. Ashizawa, and T. Nagao. "Radial Flow Bioreactor for the Creation of Bioartificial Liver and Kidney", Transplantation Proceedings, Vol. 37, P. 212–214 (2005)
- [38] Sabrina Morelli, Simona Salerno, Antonella Piscioneri, Carla Campana, Enrico Drioli and Loredana De Bartolo "Membrane bioreactors for regenerative medicine: an example of the bioartificial liver" Asia-Pac. J. Chem. Eng. Vol. 5 P. 146–159 (2010)
- [39] Ramirez-Fernandez O., Godinez R., Morales J., Gomez-Quiroz L., Gutierrez-Ruiz M.C., Zuñiga-Aguilar E., Olayo R. "Plasma gradient modified scaffolds to generate a chemoattractant surface" Superficies y Vacío; 27(1): 20-23. (2014)
- [40] G.J Cruz, J Morales, R Olayo, "Films obtained by plasma polymerization of pyrrole", Thin Solid Films Volume 342, Issues 1–2, 26; 119–126 (1999)
- [41] Zuñiga-Aguilar E., Godinez R., Ramirez-Fernandez O., Morales J., Olayo R. "Development of a Neuromuscular Junction Model on Surfaces Modified by

Plasma Polymerization” Revista Mexicana de Ingenieria Biomedica; 34:3. (2013)

[42] Ashihara Y, Kasahara Y, Nakamura RM. “Immunoassay and immunochemistry”. Henry's Clinical 3 edition (2006)

[43] Ramirez-Fernandez O., Godinez R., Morales J., Gomez-Quiroz L., Gutierrez-Ruiz M.C., Zuñiga-Aguilar E., Olayo R. “Plasma gradient modified scaffolds to generate a chemoattractant surface” Superficies y Vacío; 27(1): 20-23. (2014)

[44] Ramirez-Fernandez O., Godinez R., Morales J., Gomez-Quiroz L., Gutierrez-Ruiz M.C., Zuñiga-Aguilar E., Olayo R. “Superficies Modificadas Mediante Polimerizacion por Plasma para Cocultivos de Modelos Hepaticos”. Revista Mexicana de Ingenieria Biomedica; 33:2. (2012)

[45] Zhu X., Chi-Hwa W., Tong Y. “Growing Tissue-Like Constructs With Hep3B/HepG2 Liver Cells on PHBV Microspheres of Different Sizes” Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, Volume 82(1) P. 7-16 (2006)

[46] Zuñiga-Aguilar E., Olayo R., Ramírez-Fernández O., Morales J., Godínez R. “Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization”, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 255(7): 729-747. (2014)

[47] Bellovino D., Morimoto T., Gaetani S., “Retinol Binding Protein and Transthyretin Are Secreted as a Complex Formed in the Endoplasmic Reticulum in HepG2 Human Hepatocarcinoma Cells” Experimental Cell Research 222, P. 77–83 (1996)

[48] Aston NS., Watt N., Morton I.E., Tanner M.S., Evans G.S. “Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line).” Hum Exp Toxicol 19: 367-376, (2000)

[49] Mul F., Zuurbier A., Janssen H., Calafat J., Wetering S., Hiemstra P., Roos D., Hordijk P., “Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells”, Journal of Leukocyte Biology vol. 68 no. 4 529-537. (2000)

Apéndice A

Cuaderno de trabajo

