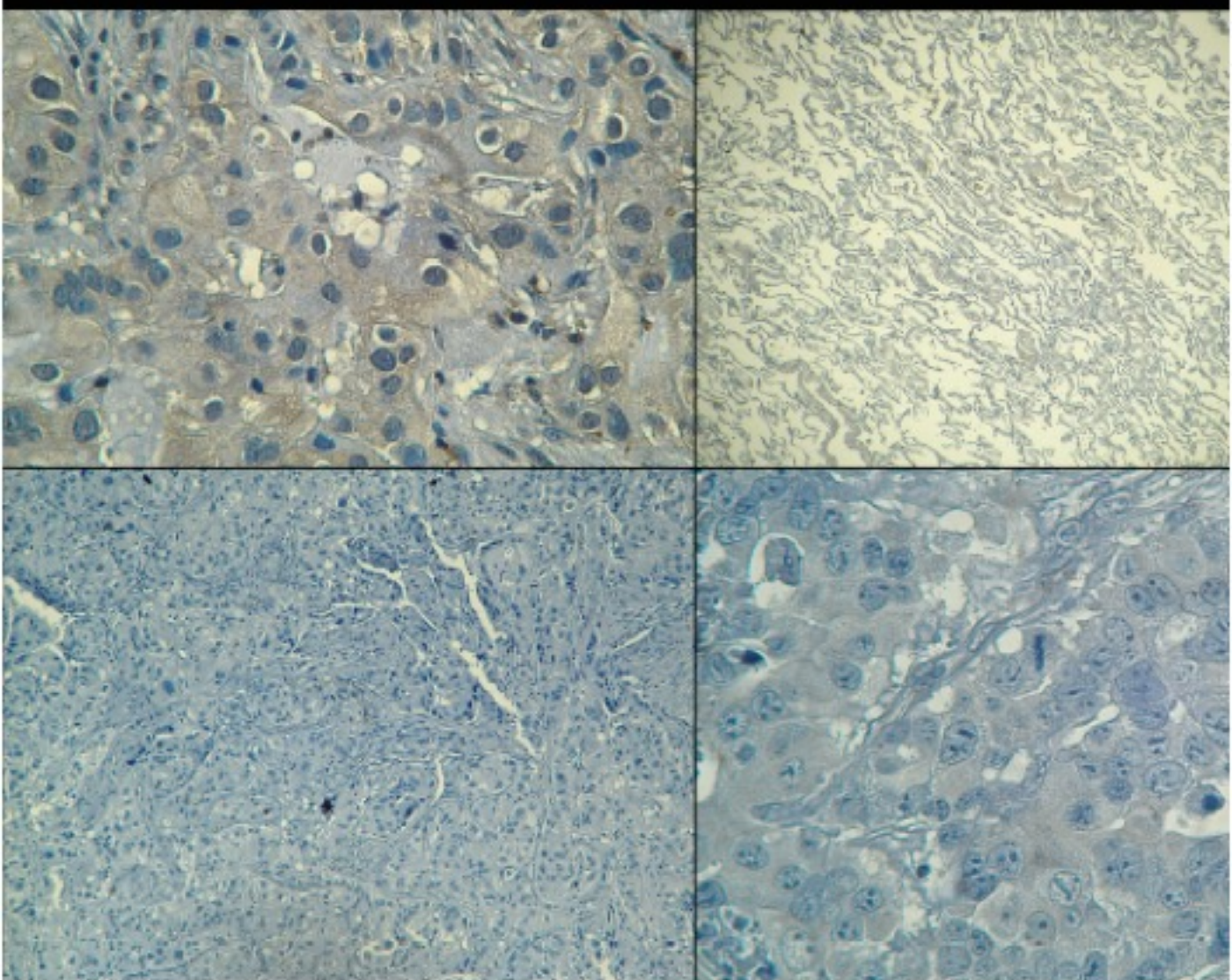


TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS



Nohra Elsy Beltrán Vargas
Claudia Haydée González de la Rosa

ISBN 978-607-28-0688-7

TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS

Elaborado por:

Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas.

Departamento de Procesos y Tecnología

nbeltran@correo.cua.uam.mx

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa.

Departamento de Ciencias Naturales

cgonzalez@correo.cua.uam.mx

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa

Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa,

Deleg. Cuajimalpa de Morelos, C.P. 05348, México, D. F.

Febrero de 2016

ISBN 978-607-28-0688-7

Índice de contenido

Presentación	8
1. Seguridad y bioética	9
Normas de trabajo en un laboratorio de cultivos celulares	9
Seguridad biológica	10
Clasificación de los agentes biológicos	11
Niveles de bioseguridad	12
Medidas de protección	12
Riesgos del trabajo con cultivos celulares	14
Riesgos en los procedimientos de cultivos celulares	15
Contención	15
Desinfección y desecho de residuos de cultivos celulares	16
Regulación en cultivos celulares e ingeniería de tejidos	16
2. Regulaciones	20
Generalidades	20
Experimentación con animales	21
Legislación a nivel mundial	22
Áreas de la investigación con células troncales	22
Regulaciones en India	22
Regulaciones en México	24
Regulación en Europa	25
3. Biología de los cultivos celulares	30
El medio ambiente del cultivo	30
Adhesión celular	31
Proliferación y diferenciación celular	33
Señalización celular	35
Iniciación de un cultivo celular	35
Evolución de los cultivos celulares	36
Desarrollo de líneas celulares continuas	37

4. Laboratorio de cultivo celular	39
Campanas de flujo laminar	39
Incubadoras	41
Microscopios	42
Centrífugas	43
Autoclaves	44
5. Técnica aséptica	46
Definiciones importantes	46
¿Cómo evitar la contaminación masiva?	47
Técnica aséptica	47
Elementos del ambiente aséptico	47
Pasos para reducir problemas de contaminación	48
6. Preparación y esterilización	50
Esterilidad	50
Manipulación estéril	51
Métodos de esterilización	51
Mecanismos de acción	52
Factores que afectan la potencia del desinfectante	52
7. Recipientes de cultivo y sustratos	54
Adhesión y crecimiento	54
Materiales usados como sustrato	54
Recipientes de cultivo	55
Superficies con matriz	58
Matrices tridimensionales	60
Sustratos no adhesivos	61
8. Medios y suplementos	62
Desarrollo de los medios de cultivo	62
Propiedades fisicoquímicas de los medios de cultivo	62
Soluciones salinas balanceadas	66
Medio completo	66
Suero	67

Selección del medio y suero	68
9. Medio libre de suero	69
Desventajas del suero	69
Ventajas del medio sin suero	70
Desventajas del medio sin suero	71
Subcultivo libre de suero	71
Selección del medio libre de suero	72
Sustitutos de suero	72
Adaptación al medio libre de suero	72
10. Cultivos primarios	74
Introducción	74
Aislamiento del tejido	76
Explante primario	76
Disgregación tisular	77
Sembrado	77
11. Subcultivo y líneas celulares	79
Propagación	79
Terminología	79
Edad del cultivo	81
Designación	81
Selección	81
Rutina de mantenimiento	82
Morfología celular	82
Reemplazo del medio	83
Medio de mantenimiento	83
Subcultivo	83
Ciclo de crecimiento	85
Propagación en suspensión	86
Estandarización de las condiciones de cultivo	86
Uso de antibióticos	86

12. Clonación y selección	88
Clonación celular	88
Aislamiento de las clonas	89
13. Caracterización	91
Autenticación	91
Morfología celular	92
Análisis de cromosomas	93
Marcadores antigénicos	93
14. Introducción a la Ingeniería de tejidos	95
Alcances de la ingeniería de tejidos	95
Tipos de tejidos del cuerpo humano	96
Obtención de un tejido con fines terapéuticos	96
Origen celular para aplicación en ingeniería de tejidos	98
Análisis del tejido	101
Descelularización	103
Retos en la ingeniería de tejidos	104
15. Aplicaciones terapéuticas	106
Células humanas	106
Áreas de aplicación de ingeniería de tejidos	107
Aplicaciones en el sistema músculo-esquelético	108
Células troncales	112
Aplicaciones en gastroenterología: Trasplante de células hepáticas	114
Aplicaciones en el sistema renal	118
Opciones de tratamiento basadas en células	119
Bioingeniería de órgano completo	120
16. Biomateriales aplicados a la medicina	124
Introducción	124
Requisitos del biomaterial para utilizarse dentro del cuerpo humano	125
Aplicaciones de los biomateriales en medicina	126
Tipos de biomateriales	126
Tipos de pruebas a los biomateriales	128

Generación de andamios para cultivos celulares	129
Pruebas para evaluar las interacciones célula-biomaterial	132
17. Inflamación y excesos de la inmunidad	134
Mecanismos de defensa	134
La inflamación mejora la inmunidad	135
Daño tisular	136
Fases de la reparación tisular	137
Los excesos de la inmunidad causan enfermedades	138
Hipersensibilidad	139
Hipersensibilidad a biomateriales	140
Respuesta del tejido a los biomateriales	141
18. Biorreactores para ingeniería de tejidos	143
Generalidades	143
Aplicaciones de los biorreactores en ingeniería de tejidos	147
Requerimientos básicos en los biorreactores	151
Acondicionamiento mecánico	152
Objetivo final del uso de biorreactores en ingeniería de tejidos	152
19. Corazón artificial	154
Infarto	155
Ingeniería tisular	157
Cultivos 2D	159
Cultivos 3D	159
Biomateriales utilizados en ingeniería de tejido cardiaco	160
Caracterización	162
Biorreactores en ingeniería de tejido cardiaco	162
20. Sangre artificial	166
Generalidades	166
Sangre del cordón umbilical	169
Fundación para la Acreditación de Terapia Celular	170
Avances en investigación	170
Sustitutos artificiales	171

21. Piel artificial	175
Generalidades	175
Quemaduras	178
Tratamientos para daños crónicos de la piel	178
Cultivos de piel	179
Sustitutos de Piel	181
Piel artificial natural	181
Piel artificial sintética	182
Biorreactores en la generación de piel artificial	183
Abreviaturas y símbolos de uso frecuente en este libro	187
Glosario	189

Presentación

La capacidad de diseñar y planear la enseñanza es una de las competencias distintivas de un ejercicio profesional de la docencia. Mediante el diseño y la planeación de cursos, los profesores están en mejores condiciones de capitalizar los conocimientos y la experiencia que van adquiriendo a lo largo de su carrera docente.

El propósito de este libro enfocado a los cultivos celulares e ingeniería de tejidos, es proporcionar al lector algunos recursos útiles y material bibliográfico en español. Está organizado en 21 capítulos, y en cada uno de ellos se contemplan los objetivos, el contenido, las actividades sugeridas y la bibliografía utilizada. Se recomienda que conforme se avance en la lectura, se releen los capítulos anteriores, con el fin de integrar los conocimientos y obtener una visión global de los elementos tratados. Debido a la naturaleza multidisciplinaria de los temas abordados y a que el lector puede tener diferentes formaciones académicas, incluimos un glosario y un listado de abreviaturas y símbolos al final de la obra, diseñados como una referencia rápida para la nomenclatura. El lector debería familiarizarse con el contenido de ambos, para utilizarlos seguidamente como referencias rápidas al leer secciones relacionadas en el texto principal.

1. Seguridad y bioética

Objetivos

- Que el alumno conozca las normas de seguridad para el adecuado uso del cuarto de cultivos celulares y la regulación que existe para el trabajo en experimentación con células.
- Que el alumno discuta sobre las responsabilidades bioéticas que se tienen al trabajar con células humanas, con fines de investigación o terapéuticos.
- Que el alumno conozca la regulación nacional e internacional para el trabajo e investigación con células.

Contenido

Es importante definir normas o reglas de trabajo en los laboratorios de cultivos celulares a fin de evitar riesgos o peligros y contaminación de los cultivos.

Se le considera peligroso a las fuentes de daño potencial o situación que potencialmente puede causar daño, mientras que se habla de riesgo cuando se refiere a la combinación de la probabilidad de ocurrencia de daño y la severidad del daño. Es importante analizar los peligros y riesgos con el objetivo de disminuirlos. La seguridad se debe garantizar en todo momento.

Normas de trabajo en un laboratorio de cultivos celulares

Es de extrema importancia lavarse las manos antes, después, y frecuentemente durante el trabajo con cultivos, para evitar contaminaciones en los experimentos, y contaminación del usuario con material biológico, y posible diseminación de éste. Se debe hacer uso de bata exclusiva para el cultivo celular, guantes, cubrebocas y lentes protectores.

Las personas que estén involucradas con el trabajo en cultivos celulares y tisulares deben tener las uñas de las manos cortas y limpias, evitar el uso de pantalones cortos o faldas, ya

que las piernas quedan desprotegidas de cualquier salpicadura, deben tener el cabello corto o recogido y usar zapatos que cubran totalmente el pie con suela anti-derrapante.

Otras normas de trabajo generales son lavarse las manos con agua y jabón al ingreso y egreso del laboratorio, aun cuando haya utilizado guantes para la realización de sus actividades; con esto se minimiza la contaminación biológica.

Hay que trabajar siempre con material estéril (pipetas, puntas, etc). El material estéril sólo puede abrirse, lógicamente, dentro de la campana de cultivos, o a la llama del mechero.

Por defecto, todo aquello de lo que no se esté seguro al 100% de su esterilidad ha de ser considerado como no estéril. “Asumir” que algo está estéril cuando no lo está supone, sin ninguna duda, contaminar (esto es, destruir) el experimento.

En caso de contaminar algo involuntariamente (o incluso sospechar que esto ha pasado), se debe poner inmediatamente en conocimiento del responsable del laboratorio, para evitar problemas que puedan trascender a otros usuarios del laboratorio.

Marcar siempre cualquier tubo o recipiente que contenga algo útil, de la forma más segura posible, por ejemplo tanto en la tapa como en el tubo. Marcar siempre las placas de cultivos en la tapa y en un lateral de la base, de manera distinta para cada placa, para evitar intercambiar tapas.

Si se ha de pipetear repetidamente un stock de una solución (p.ej. botella con medio de cultivo) es conveniente sacar de una vez la alícuota que se vaya a usar a una botella o tubo de menor volumen, para disminuir el número de veces que se introducen pipetas en la botella con el stock, y el consiguiente riesgo de contaminación.

Seguridad biológica

Es obligatorio lavarse las manos después del trabajo de laboratorio, para evitar contaminación del usuario con material biológico, y la potencial dispersión de éste.

Todo el material biológico, p. ej. células o material que haya estado en contacto con éstas, debe ser inactivado con hipoclorito antes de tirarlo.

Tanto el plástico desechable como el vidrio que haya estado en contacto con material biológico deberá ser inactivado antes de tirarlo, o disponerlo para su lavado y esterilización.

Los residuos acumulados en vasos de precipitados deben ser inactivados con hipoclorito antes de tirarlos, y los vasos se dejarán con un poco de hipoclorito hasta su próximo uso. La

mesa de trabajo y las campanas se descontaminarán antes y después de trabajar con material biológico. Cualquier material biológico derramado deberá ser descontaminado inmediatamente con hipoclorito, antes de proceder a secar y lavar con jabón la superficie manchada.

Clasificación de los agentes biológicos

Los agentes biológicos se clasifican, en función del riesgo de infección, en cuatro grupos:

Agente biológico del grupo 1: aquél que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre.

Agente biológico del grupo 2: aquél que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz.

Agente biológico del grupo 3: aquél que puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz.

Agente biológico del grupo 4: aquél que causando una enfermedad grave en el hombre supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas probabilidades de que se propague a la colectividad y sin que exista generalmente una profilaxis o un tratamiento eficaz.

Los riesgos en los que se puede incurrir de acuerdo a los agentes biológicos se enlistan en la Tabla 1.1.

Grupos de riesgo	Riesgo infeccioso	Ejemplo	Riesgo de propagación a la colectividad	Profilaxis o tratamiento eficaz
1	Poco probable que cause enfermedad	Virus de Epstein-Barr	No	Innecesario
2	Pueden causar enfermedad y constituir un peligro para los trabajadores	Virus de la hepatitis A	Poco probable	Posible generalmente
3	Puede provocar enfermedad grave y constituir un serio peligro para los trabajadores	Virus del dengue	Probable	Posible generalmente

4	Provocan enfermedad grave y constituyen un serio peligro para los trabajadores	Virus de la inmunodeficiencia humana	Elevado	No conocido en la actualidad
---	--	--------------------------------------	---------	------------------------------

Tabla 1.1. Grupos de riesgo de los agentes biológicos.

Niveles de bioseguridad

Atendiendo a los agentes biológicos con los que se va a trabajar, los laboratorios se clasifican como sigue:

- Laboratorio básico – nivel de bioseguridad 1
- Laboratorio básico – nivel de bioseguridad 2
- Laboratorio de contención – nivel de bioseguridad 3
- Laboratorio de contención máxima – nivel de bioseguridad 4

Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo.

Medidas de protección

Se reducirá el riesgo de exposición al nivel más bajo posible para garantizar adecuadamente la seguridad y la salud de los trabajadores, por medio de las siguientes medidas:

- a) Establecimiento de procedimientos de trabajo adecuados y utilización de medidas técnicas apropiadas para evitar o minimizar la liberación de agentes biológicos en el lugar de trabajo.
- b) Reducción, al mínimo posible, del número de trabajadores que estén o puedan estar expuestos.
- c) Adopción de medidas seguras para la recepción, manipulación y transporte de los agentes biológicos dentro del lugar de trabajo.
- d) Adopción de medidas de protección colectiva o, en su defecto, de protección individual, cuando la exposición no pueda evitarse por otros medios, utilizando siempre las medidas de contención adecuadas en función del grupo de riesgo en que el agente biológico haya sido clasificado.

- Sustitución de los agentes biológicos por otros de menor peligro.
- Confinamiento de los agentes biológicos, obligatorio en el caso de utilización deliberada de los mismos, utilizando las medidas de contención adecuadas en función del grupo de riesgo en que el agente biológico haya sido clasificado.
- Aplicación de procedimientos de trabajo que permitan el encerramiento o aislamiento de operaciones potencialmente peligrosas.
- Extracción localizada, que consigue reducir las concentraciones de contaminantes antes de difundirse en el medio de propagación. Implica la utilización de cabinas de seguridad biológica.
- La desinfección de los locales, vehículos de transporte, ropa, equipos de protección, que debe realizarse siguiendo un protocolo que asegure la acción específica y eficaz sobre los agentes biológicos.
- Desinsectación (control y eliminación de insectos y otros artrópodos) y desratización (control de roedores), que tienden a eliminar los vectores, como transportadores de la enfermedad. La realización de estas operaciones, puede ocasionar problemas de salud a los ocupantes de los lugares de trabajo, por lo que dichas operaciones han de efectuarse según procedimientos seguros.
- Limpieza adecuada, que conduce en muchos casos a una disminución de los niveles de contaminación.

Las medidas de protección a nivel individual se basan fundamentalmente en los equipos individuales de protección. Su elección corresponderá a dos criterios: seguridad, es decir, protección adecuada al riesgo específico, y confort.

- e) Utilización de medios seguros para coleccionar, almacenar y desechar residuos por parte de los trabajadores, incluido el uso de recipientes seguros e identificables, previo tratamiento adecuado si fuese necesario.
- f) Utilización de medidas de higiene que eviten o dificulten la dispersión del agente biológico fuera del lugar de trabajo.
- g) Utilización de una señal de peligro biológico así como de otras señales de advertencia pertinentes.

Riesgos del trabajo con cultivos celulares

Los cultivos celulares son el resultado del crecimiento *in vitro* de células obtenidas de organismos pluricelulares. Tienen la categoría de agentes biológicos y se refiere, tanto a los cultivos celulares primarios, como a los de líneas continuas o cepas celulares bien definidas.

Los cultivos celulares no contaminados generalmente no presentan un riesgo significativo, y aun la inoculación dérmica origina sólo una inflamación local. Además, estos cultivos pueden contribuir sustancialmente al riesgo de exposición a agentes biológicos ya que pueden actuar como la base de crecimiento o ayudar a la supervivencia o la replicación de agentes oportunistas, o ser origen de otros riesgos potenciales. Los agentes oportunistas más característicos son los virus y entre los otros riesgos pueden citarse la contaminación por micoplasmas o productos celulares que pueden ser moléculas biológicamente activas con propiedades farmacológicas, de inmunomodulación o sensibilizantes.

El nivel de riesgo que presenta el trabajo con cultivos celulares es variado. Por un lado se debe considerar si las cepas o líneas celulares utilizadas tienen una procedencia lo suficientemente documentada para garantizar y evitar la problemática asociada con la contaminación cruzada de la línea celular original por otro tipo de células.

Respecto a los cultivos celulares habrá que considerar asimismo tanto su origen anatómico como el de la especie, ya que está directamente relacionado con su potencial infeccioso por virus u otros agentes patógenos en humanos. En ningún caso el trabajador que realice los cultivos celulares podrá utilizar sus propias células para el desarrollo *in vitro*. Las células humanas para cultivo deberán obtenerse solamente de individuos que no tengan relación con el trabajo experimental.

Los cultivos celulares de mayor riesgo son los que proceden de primates y humanos, especialmente si derivan de sangre periférica, tejido linfoide y nervioso. Cuando se sospeche la infección del cultivo celular por un agente patógeno para el hombre, dichos cultivos deberán ser manejados en un nivel de contención adecuado al agente en cuestión. La elección del nivel de contención, según el origen del cultivo celular, se muestra en la Tabla 1.2. Hay un riesgo adicional en el caso de cultivos celulares genéticamente modificados.

Cultivo celular	Contención
Líneas celulares bien caracterizadas de origen humano o de simios.	Nivel de contención 2 y empleo de cabina de bioseguridad.
Líneas celulares no humanas ni de simios bien caracterizadas, con bajo riesgo de infección endógena con patógenos humanos.	
Líneas celulares o cepas no totalmente caracterizadas o autenticadas.	Nivel de contención 2 y empleo de cabina de bioseguridad.
Células con patógenos endógenos y células deliberadamente infectadas.	Contención apropiada al patógeno.
Células sanguíneas humanas, células linfoides, tejido nervioso de origen humano o simio.	Contención apropiada al riesgo potencial.

Tabla 1.2 Nivel de contención de acuerdo al origen del cultivo.

Riesgos en los procedimientos de cultivos celulares

En la manipulación de cultivos celulares deberán minimizarse todas las tareas que contribuyan a la formación de aerosoles o salpicaduras: trasvases, derrames, pipeteos continuados y rápidos. Las agujas no deberán utilizarse si existe una alternativa razonable. Como en todo trabajo con material infeccioso o potencialmente infeccioso, deberán utilizarse cabinas de seguridad biológica, las cuales estarán correctamente instaladas y regularmente mantenidas y comprobadas.

Algunos productos celulares pueden ser alergénicos por lo que en estos casos se requerirán unos estrictos niveles de contención primaria y/o protección personal de los trabajadores para prevenir la inhalación o el contacto con las mucosas.

Contención

Como se indicó en la Tabla 1.2, cuando hay evidencia o sospecha de la presencia de patógenos (por ejemplo: Herpes virus *simiae* en tejidos de simios o VIH en células blancas de sangre periférica), los cultivos celulares se manipularán en el nivel de contención

requerido para el patógeno en cuestión. Todos los procedimientos implicados en la propagación y manipulación de cultivos celulares que estén contaminados deberían llevarse a cabo como mínimo en el nivel de contención 2.

Cuando se utilice sólo un pequeño número de células con un bajo riesgo de infección y no se encuentren en fase proliferativa podrá no ser necesaria la cabina de seguridad.

Desinfección y desecho de residuos de cultivos celulares

Es necesaria la existencia de normas efectivas para la descontaminación de todos los materiales utilizados en relación con los cultivos celulares y fluidos de desecho.

Los procedimientos de descontaminación deberán ser capaces de inactivar virus y otros agentes contaminantes aun en presencia de fluidos con una elevada carga de material orgánico. La descontaminación química es por esta causa menos efectiva que la que se obtiene por calor.

Regulación en cultivos celulares e ingeniería de tejidos

Las regulaciones son el resultado de un sistema de ordenamiento, el cual cuenta con procesos e instituciones a través de los cuales estas son desarrolladas, promulgadas y llevadas a cabo, son instrumentos legales, decisiones, leyes parlamentarias, legislaciones subordinadas, decretos, órdenes, normas, licencias y códigos mediante los cuales los gobiernos establecen condiciones en la conducta de los ciudadanos, las empresas y el gobierno mismo.

La ingeniería de tejidos es una innovación biomédica emergente rodeada de potencialidad y riesgos. El uso de tejidos y células humanas para investigación y terapias han resultado ser de gran importancia, por lo que muchas cuestiones éticas y de regulación se han visto envueltas en estos, en diversas culturas algunas partes del cuerpo o de tejidos son consideradas sagradas, como es el caso de la placenta, por esto se considera que el tejido humano se merece cierto grado de respeto y por razones de dignidad de la persona que dona el tejido, se crean ciertas regulaciones y reglas, que comúnmente se encuentran indicadas en leyes, normas y procedimientos.

En cuanto a regulaciones, en México no se cuenta con alguna norma o ley puntual que indique los procedimientos que se pueden realizar con células troncales o en cultivo de tejidos, así como en cuestiones de donación o venta de células o tejidos.

A nivel mundial, en algunos países no existen y en otros tienen unas regulaciones meticulosas y constantemente revisadas. En la Unión Europea (UE) se realizó un análisis de riesgos sobre la ingeniería tisular según la opinión de médicos y científicos. En 2003 la UE comenzó a implementar un control unificado de reglamentos para productos provenientes de la ingeniería de tejidos, y productos medicinales biológicos. En ciertos países como el Reino Unido ya hay un gran número de productos que se encuentran en el mercado.

Existen dos puntos importantes para la regulación en la ingeniería tisular:

El primero es el control de la calidad, los aspectos de seguridad de los tejidos humanos y las células propuesta por la Dirección Responsable de Salud Pública de la Comisión Europea. El segundo es que se pueda facilitar la comercialización de los tejidos, producto de la ingeniería.

En Estados Unidos, la regulación de investigaciones de células troncales está influenciada por la política establecida en el momento, la sociedad y sobretodo el congreso que ejerce presión, puesto que los decretos cambian de acuerdo al gobierno del momento.

En los países asiáticos la investigación prevalece ante la mención de que es el continente donde las investigaciones sobre células troncales y en especial embrionarias humanas, lograrían tener resultados trascendentales, debido a las estrategias que implementan en biotecnología y ciencias médicas e incluso podría ser la primera oportunidad de ejercer un dominio total en este campo, pues poseen características muy peculiares, como el hecho de que son sumamente competitivos, cuentan con niveles de excelencia científica y la convergencia del mismo objetivo en la ciencia.

Las células troncales las consideraron como un potencial económico, hoy en día Singapur es el centro de investigaciones a nivel internacional en este ámbito. La reglamentación implementada está basada en un marco legal y ético fundado en el año 2000 sobre células troncales por la Ley de prohibición de clonación humana y otras prácticas, quien limita y prohíbe prácticas que no sean dispuestas en dicha ley por lo que estipula “La clonación humana reproductiva está formalmente prohibida, así como la exportación e importación de embriones clonados y la comercialización de embriones, ovocitos y espermatozoides humanos. La

clonación terapéutica está autorizada. Se permite la investigación en embriones humanos, mientras que éstos no excedan los 14 días. La ley exige determinados puntos que se deben de cumplir sin excepción: es necesario tener la información de los donantes así como su aprobación, tener justificación alguna para la utilización y la derivación de células troncales embrionarias con base a un objetivo científico y de beneficio potencial, la autoridad que rige esta ley otorga licencias que aseguren la regulación y el debido control de las investigaciones sobre las células troncales humanas. Siendo así su reglamento uno de los más atractivos para los investigadores extranjeros ofreciéndoles circunstancias estables para el desarrollo de sus investigaciones.

En Japón la situación con respecto al marco reglamentario fue definido de forma rápida lo que originó un desarrollo dinámico en la investigación pública. Su marco reglamentario sobre células troncales se elaboró en el año 2000 bajo la jurisprudencia del Consejo Científico de Japón (SCJ) quien aprobaba la investigación en células troncales humanas utilizando embriones supernumerarios provenientes de procesos de fecundación *in vitro*. En 2001, quedó prohibida la clonación de células humanas, pero no la clonación terapéutica ya que esta ley autoriza la creación de células troncales embrionarias humanas con fines terapéuticos siempre y cuando estuvieran bajo el control del gobierno. La regulación en los centros de investigación estaba dada bajo el Consejo de Ciencia y Tecnología (SCJ), que aprobaba los programas de investigación y quien tenía la facultad de decidir interrumpirlo en cualquier momento.

Para el manejo seguro de los cultivos celulares es necesaria una valoración adecuada de los riesgos, una buena organización del trabajo y la aplicación de los principios de las buenas prácticas en el laboratorio. Es importante adoptar procedimientos de separación que prevengan la transmisión accidental de agentes infecciosos de un cultivo a otro. Para evitar dicha transmisión así como la contaminación cruzada entre células, sólo deberá manipularse una línea celular cada vez, utilizando métodos adecuados de descontaminación, especialmente en las operaciones desarrolladas entre diferentes tipos de células.

Actividades sugeridas

- Investigar sobre las normas que existen en México y otros países para el trabajo con células y tejidos.
- Realizar lectura sobre riesgos en cultivos celulares.
- Realizar lecturas sobre bioética y ética en experimentación animal y humana.
- Revisar el artículo de Yandell K. Privacy and the HeLa Genome. 2013. Disponible en: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/34840/title/Privacy-and-the-HeLa-Genome/> Consultado Junio 14, 2014.
- Identificar los diferentes tipos de agentes biológicos que pueden poner en riesgo al personal que trabaja en un laboratorio de cultivo celular.
- Consultar el manual de bioseguridad para laboratorio de investigación biomédica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosi y hacer un resumen de los aspectos generales de seguridad que se deben considerar en los laboratorios de cultivos celulares/tisulares.
- Describir los tipos de protección que se deben tener al vestir y manipular sustancias en los laboratorios biomédicos.

Bibliografía

Freshney RI. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

Riesgo biológico en laboratorios. Universidad de Salamanca.
<http://www.usal.es/webusal/files/GU%C3%8DA%20RIESGO%20BIOL%C3%93GICO%20EN%20LABORATORIOS.pdf>

Illman J. Gene Therapy in Europe: New Initiatives Seek Streamlined Debate. NCI J Natl Cancer Inst 92(3): 188-190; 2000.

http://ec.europa.eu/health/index_en.html

<http://www.moga.mo.gov/>

<http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Bioseguridad/MBLIB-v5.pdf>

http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/docs/agentes_biologicos.pdf

2. Regulaciones

Objetivos

- Que el alumno conozca la regulación existente en ingeniería de tejidos y los aspectos a considerar para generar y comercializar tejidos artificialmente.

Contenido

Generalidades

Mucho de lo que se realiza actualmente en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa tiene que ver con la investigación, ya que aún falta por conocer muchas cosas del cuerpo humano y su correcto funcionamiento para poder sustituirlo artificialmente.

Los ingenieros como investigadores, tienen el interés de asegurar que cualquier investigación biológica se lleve de manera responsable y que avance en beneficio de la sociedad.

La moral se extiende más allá de la legalidad. Hacer lo que es "correcto" es más que simplemente evitar lo que está "mal". Se requiere un enfoque proactivo y preventivo. La bioética debe integrar todo el proyecto de investigación.

El entorno regulado en el que los investigadores trabajan pueden tentarlos a simplemente "seguir las reglas". Ciertamente, las reglas son importantes, pero la legalidad y la moralidad no son totalmente inclusivas.

En la Declaración de Helsinki se menciona que para realizar investigación biomédica en seres humanos es necesario basarse en principios científicos aceptados, una exhaustiva revisión bibliográfica y en experimentación previa en animales. Se debe realizar un protocolo experimental en donde se expliquen los objetivos y los riesgos en contra de los beneficios para los voluntarios. Este protocolo debe ser revisado por un comité independiente de la institución que llevará a cabo la investigación. La investigación debe

realizarse por personal calificado y la responsabilidad de los voluntarios recaerá siempre en el personal médico y no en el investigador.

Se deben respetar los derechos de los voluntarios y los médicos deben ser los encargados de informar a los voluntarios sobre los objetivos, los métodos, riesgos y beneficios del estudio.

Los voluntarios deben firmar un conocimiento informado al cual pueden renunciar en cualquier momento del estudio. En caso de que el médico considere no obtener el conocimiento informado, la razón específica debe ser declarada en el protocolo experimental. En caso de que el voluntario sea un menor o una persona discapacitada el consentimiento lo puede autorizar un representante legal.

En el tratamiento de las personas enfermas el médico debe tener la libertad de ajustar su diagnóstico y medidas terapéuticas de acuerdo a su juicio con el fin de salvar la vida y restablecer la salud. En cualquier estudio médico los voluntarios que participan deben contar con los mejores diagnósticos y métodos terapéuticos.

Con la obtención del consentimiento informado se da la autorización legal para proceder con el estudio, para la utilización legal de los datos obtenidos para fines profesionales o de investigación, esto, sin que el voluntario pueda llevar a cabo cualquier demanda por lesión o agresión y protegiendo al investigador frente a cualquier reclamación.

Experimentación con animales

Se deben tener en cuenta los requisitos que establecen las normas (NOM-062-ZOO-1999) de las instituciones de salud. Hay que cuidar los siguientes aspectos:

- Se debe evitar al máximo el sufrimiento de los animales
- Para sacrificar un animal se debe usar un procedimiento que garantice una muerte sin sufrimiento
- Los bioterios deben proporcionar un máximo de comodidad, excepto cuando las variables experimentales justifiquen la situación

La NOM-062-ZOO-1999 considera lo siguiente:

- Reglamentación de bioterios para el cuidado de los animales
- Especificaciones sobre personal encargado de los animales
- Especificaciones sobre cuidados e higiene de los animales

- Obtención de animales con documentación
- Marcaje de los animales
- Aplicación de eutanasia con procedimientos que causen el menor sufrimiento posible

Legislación a nivel mundial

En la actualidad se han demostrado distintas legislaciones que prevalecen en muchos países; sin embargo para el uso de células troncales, Estados Unidos y Reino Unido cuentan con amplias aprobaciones tanto en investigación como en el campo de aplicaciones. Caso contrario sucede con las normatividades de países como Alemania, México, Panamá, Nicaragua y Centroamérica que bajo sus normas limitan a la ciencia tratando de proteger la integridad del individuo.

Áreas de la investigación con células troncales

Actualmente se está trabajando ampliamente en investigación con células troncales debido a la capacidad que tienen de dividirse y diferenciarse en diversos tipos celulares especializados, además de autorrenovarse para producir más células troncales. La mayoría de tejidos de un organismo adulto tienen una cierta población residente de células troncales que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular. Algunas células troncales adultas son capaces de diferenciarse en más de un tipo celular como las células troncales mesenquimales y las células troncales hematopoyéticas, mientras que otras son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como por ejemplo las células troncales de la piel, músculo o las gonadales.

Regulaciones en India

a) Áreas permisibles de investigación

- Los estudios sobre células troncales pluripotentes en líneas celulares troncales embrionarias, conocidas como hES, células germinales embrionarias (hEG), iPS o células troncales fetales o de adulto, puede llevarse a cabo con la revisión y aprobación del Pacto Internacional de Derechos Económicos Sociales y Culturales conocido por sus siglas IC-SCR, “Institute Committee – Stem Cell Research” de la

India, siempre que la línea celular sea registrada en el, *National Apex Committee for Stem Cell Research and Therapy* (NAC-SCR) de la India.

- El establecimiento de nuevas líneas de células hES de embriones que provienen de sobrantes no utilizados en el programa de fecundación *in vitro*, o líneas celulares iPS con la aprobación previa de la IC-SCR y del *Institutional Ethics Committee* (IEC). Una vez que la línea celular se ha establecido, será registrada con el IC-SCR y SCR-NAC y depositada en un banco de células para su uso por otras personas.

Los niveles de manipulación celular se dividen en tres tipos, los cuales están descritos a continuación:

Tipo de manipulación	Descripción
Mínima	No se hacen alteraciones mayores a la población celular, esto incluye el uso de reactivos de grado clínico además de lavado, centrifugación, etc. Todos los procedimientos de laboratorio que no excedan de unas pocas horas, evitar el uso de productos de origen animal y se lleva a cabo bajo condiciones asépticas estrictas.
Más de mínima	Se definen como alteraciones en la población de células (por ejemplo el agotamiento de las células T, cancerosas etc.), se llevan a cabo expansiones que resultan en alteración de la función, todo se lleva a cabo bajo condiciones asépticas estrictas y en pocos días.
Manipulación mayor	Cultivo de células a largo plazo a través de múltiples subcultivos, acompañado de modificaciones genéticas mediante inserción de genes o siRNA.

b) Áreas restringidas de investigación

- Estudios con quimeras, en donde las células troncales de diferentes especies están mezcladas y son introducidas en animales, lo cual requiere la aprobación de la NAC-SCR.
- Estudios que requieran de la importación de células troncales, los cuales tienen que ser aprobados por la NAC-SCR.
- Estudios que requieran la creación de un cigoto humano por fecundación *in vitro* y transferencia de células somáticas nucleares (SCNT) o cualquier otro método para obtener líneas celulares hES. En este caso la justificación debe ser aprobada por la NAC-SCR a través del IEC y el IC-SCR, explicando por qué la creación del cigoto

es crítica y esencial para la investigación propuesta, indicando el procedimiento para la donación de óvulos, espermias, etc.

- Estudios que requieran la introducción de células hES-/hEG-/iPS a animales para estudios de diferenciación e integración de células humanas a tejidos no humanos. Para que estos sean aprobados deben contar con una justificación muy fuerte. No se puede permitir que los animales se reproduzcan. Estos estudios son aprobados por NAC-SCR y revisados por la IAEC y IC-SCR/IEC.

c) Áreas prohibidas de investigación

- Cualquier investigación relacionada con ingeniería genética germinal humana o clonación reproductiva.
- Transferencia de blastocitos humanos a un útero humano o no humano.
- Cualquier cultivo *in vitro* de embrión humano intacto o estructuras organizadas celulares que tengan el potencial de convertirse en órganos humanos sin importar su derivación después de los 14 días de la derivación de la línea primitiva.
- Investigaciones con células que no fueron donadas para investigación.
- Cualquier investigación que implique la implantación del embrión humano en el útero después de la manipulación *in vitro*, en cualquier etapa del desarrollo ya sea en útero humano o animal.

Regulaciones en México

Para que los tejidos puedan ser utilizados con fines terapéuticos en seres humanos tienen que ser sometidos a diversos tratamientos mecánicos para destruir y remover células nativas, eliminando riesgos sanitarios. Estos procesos engloban el término disposición, que es el conjunto de actividades relativas a la obtención, recolección, análisis, conservación, preparación, utilización y destino final de órganos, tejidos etc. con fines terapéuticos de docencia o de investigación.

En México, los tejidos que son sometidos a procesos de disposición, se consideran insumos para la salud, que son los medicamentos, sustancias psicotrópicas, estupefacientes, materias primas y aditivos que intervienen en su elaboración, así como equipo, material quirúrgico entre otros. Debido a esto las regulaciones de insumos, caen dentro del

Reglamento de Insumos para la Salud, el cual es regulado por la Comisión Federal para la Prevención contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

Así mismo existe otro organismo regulador, que supervisa la distribución y asignación de órganos y tejidos donados y que mantiene los registros de donante-receptor. Este organismo es el Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA), que depende de la Secretaría de Salud. Por lo tanto para tejidos con fines terapéuticos ambos organismos regulan diferentes etapas del proceso, el CENATRA regula la parte de identificación del donador y procuración del tejido, por medio de la Coordinación de Donación de Órganos y Tejidos con Fines de Trasplante, mientras que la COFEPRIS regula el procesamiento, almacenamiento y distribución final del tejido, por medio del Reglamento de Insumos.

Regulación en Europa

En Europa, la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT), que es una de varias asociaciones encargada de establecer las normas de calidad y de seguridad para la donación, obtención, evaluación, procesamiento, preservación, almacenamiento y distribución de células y tejidos humanos, hace hincapié en los tratados y propuestas hechos por el Parlamento Europeo y El Consejo de la Unión Europea. Entre los puntos tratados en la AEBT, esta las obligaciones de los estados miembros de la asociación para con el uso de las células y tejidos.

La Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo, establece normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y de tejidos humanos. Considera la supervisión de la obtención de órganos y tejidos, así como la acreditación y autorización para la generación de establecimientos de tejidos, y es muy rigurosa en la trazabilidad que se da a los tejidos o células utilizadas en un procedimiento. A continuación se describen brevemente los aspectos que involucra la legislación europea.

Con la modificación al artículo 152 del Tratado CE (ahora artículo 168 TFUE), la Unión Europea establece altos niveles de calidad y seguridad para la utilización de sangre, órganos y sustancias de origen humano. Especialmente hay varias disposiciones en relación a la sangre humana y sus componentes.

En 1998, el Grupo Europeo de ética de la ciencia y de las nuevas tecnologías (GEE) planteó la importancia de efectuar un control de las condiciones de circulación de células y tejidos humanos, cuya donación, anónima y gratuita, debía ser un acto voluntario. Además, la utilización creciente de células y tejidos humanos en tratamientos terapéuticos como cirugía reconstructiva, tratamiento del cáncer o de la diabetes, así como el aumento de intercambios intracomunitarios de dichas sustancias, hicieron necesario definir una base reglamentaria mínima.

Los tejidos proceden de donantes que pueden estar vivos o haber fallecido, y pueden ser: huesos y elementos musculoesqueléticos (cartílagos, tendones), tejidos cardiovasculares (arterias, venas y válvulas cardíacas), tejido ocular (córnea), células nerviosas y cerebrales, piel, tejido fetal, células reproductivas (semen, espermatozoides y óvulos) y células troncales.

La Directiva se aplica además a productos elaborados derivados de células y tejidos humanos destinados a su aplicación en seres humanos. En cuanto a los productos industriales derivados de tejidos y células, la Directiva solamente se aplica a la donación, la obtención y la evaluación de los mismos.

Se excluyen la sangre y sus componentes, los órganos, los tejidos y las células utilizadas como injertos autólogos dentro del mismo procedimiento quirúrgico, así como las células autólogas destinadas a la fabricación de medicamentos.

Los Estados miembros garantizarán que la obtención y la evaluación de células y tejidos sean efectuadas por personal con formación y experiencia adecuadas y que se realicen en las condiciones acreditadas por autoridad competente.

Todos los establecimientos de tejidos deberán estar acreditados, designados o autorizados por una autoridad competente, la cual también podrá suspender o retirar la acreditación, la designación o la autorización si al realizarse inspecciones se demostrara que el establecimiento no cumple los requisitos de la Directiva.

Las autoridades competentes deben organizar inspecciones y controles en los establecimientos cada dos años. Cuando la Comisión u otro Estado miembro lo solicite, los Estados miembros deberán facilitar la información correspondiente a los resultados de dichas inspecciones y controles.

Los Estados miembros garantizarán la trazabilidad del donante al receptor, y viceversa, de todas las células y tejidos obtenidos, tratados, almacenados o distribuidos en su territorio.

Esa trazabilidad también se aplicará a los productos y materiales que entren en contacto con tejidos y células. Para esto, garantizarán la puesta en práctica de un sistema de identificación de donantes que asigne un código único a cada donación y a cada uno de los productos asociados con ella. Todos los tejidos y células deberán estar identificados con una etiqueta que contenga la información correspondiente a los procedimientos de obtención y de recepción, a su procesamiento, almacenamiento y distribución. Toda la información de trazabilidad debe ser guardada por mínimo 30 años a partir de la fecha en que fueron utilizados.

En cuanto a la importación y exportación de células y tejidos, los Estados miembros velarán por que todas las importaciones y exportaciones de células y tejidos humanos procedentes de terceros países o dirigidos a ellos cumplan los requisitos de calidad y seguridad establecidos en la Directiva. Las importaciones/exportaciones deberán ser efectuadas por establecimientos de tejidos acreditados, designados o autorizados, a fin de garantizar la trazabilidad de los tejidos y las células.

También se debe garantizar la existencia de un sistema para notificar, registrar y transmitir información sobre incidentes relacionados con la obtención, la evaluación, el procesamiento, el almacenamiento, la distribución y trasplante de tejidos y células.

Directiva 2006/17/CE de la Comisión, de 8 de febrero de 2006, por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos [Diario Oficial L 38 de 9.2.2006].

En esta Directiva de aplicación se establecen requisitos técnicos específicos para cada uno de los pasos del proceso de preparación de células y tejidos humanos. Se trata, en particular, de:

- los requisitos en materia de obtención de células y tejidos humanos;
- los criterios de selección de donantes de células y tejidos;
- las pruebas de laboratorio necesarias para los donantes;
- los procedimientos de donación y obtención de células y tejidos y recepción en el centro de tejidos;
- los requisitos para la distribución directa al receptor de células y tejidos específicos.

Directiva 2006/86/CE de la Comisión, de 24 de octubre de 2006, por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los requisitos de trazabilidad, la notificación de las reacciones y los efectos adversos graves y determinados requisitos técnicos para la codificación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos.

La presente Directiva se aplica a la codificación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos, así como a los productos preparados a partir de ellos.

Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.

Actividades sugeridas

- Investigar sobre las normas que existen en México y otros países para el trabajo en ingeniería de tejidos.
- Realizar lectura sobre riesgos en cultivos celulares.
- Realizar lecturas sobre bioética y ética en experimentación animal y humana.

Bibliografía

Vallero DA. Biomedical ethics for engineers. Elsevier; 2007.

Mathur J. Guidelines for Stem Cell Research. ICMR: 1- 45; 2012.

Ley General de Salud. Título XIV: Donación trasplante y pérdida de la vida: Capítulo I. Disposiciones comunes. Artículo 314 Fracción XVII. (Últimas reformas DOF 11-06-2009)

Ley General de Salud. Título XII: Control sanitario de productos y servicios de su importación y exportación: Capítulo I. Disposiciones Comunes. Artículo 194 Bis. (Últimas reformas DOF 11-06-2009).

Directiva 2004/23/ce del parlamento europeo y del consejo. Capítulo III: Obligaciones de las autoridades de los estados miembros. Disponible en:

<http://www.aebt.org/web/info/legal/DirectivaTejidos.pdf>

www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html

www.senasica.gob.mx/?doc=743

http://europa.eu/legislation_summaries/public_health/threats_to_health/c11573_es.html

3. Biología de los cultivos celulares

Objetivos

- Que el alumno conozca un panorama global del cultivo de células de mamífero.
- Que el alumno sea capaz de identificar las diferentes estructuras celulares y macromoléculas de relevancia en el cultivo.
- Que el alumno sea capaz de reconocer que las células son dinámicas y no estáticas, que sus moléculas están constantemente en movimiento, recibiendo señales externas y respondiendo a ellas.
- Que el alumno sea capaz de distinguir que las células no se encuentran aisladas, sino que forman parte de tejidos, y que éstos tienen diferentes características morfológicas y funcionales.

Contenido

El medio ambiente del cultivo

Se le llama cultivo celular a la propagación de células fuera del organismo de origen. Su utilidad es múltiple y dentro de sus ventajas encontramos las siguientes:

- a) Fácil manipulación bajo condiciones controladas
- b) Alternativa al uso de animales
- c) Permite trabajar en pequeña, mediana y gran escala
- d) Las células pueden mantenerse congeladas por largos períodos de tiempo con mínima pérdida de viabilidad
- e) Menor variabilidad debido a que se tiene un cultivo de un linaje celular definido
- f) Se cuenta con acceso fácil a múltiples líneas celulares en bancos internacionales

En ocasiones, la validez del cultivo celular (Figura 3.1) como modelo de funciones fisiológicas es limitada, porque puede ocurrir que el fenotipo no sea el correcto por cambios en el microambiente. Esto se debe a que las interacciones célula-célula y célula-matriz que

ocurren en un organismo vivo no son las mismas que se establecen *in vitro*, hay menor heterogeneidad, se pierde la arquitectura tridimensional y no están los mismos estímulos hormonales y nutricionales (Figura 3.2).

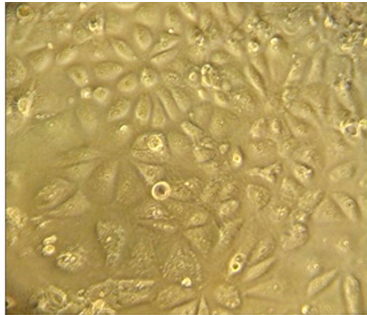


Fig. 3.1 Células epiteliales en cultivo (queratinocitos)

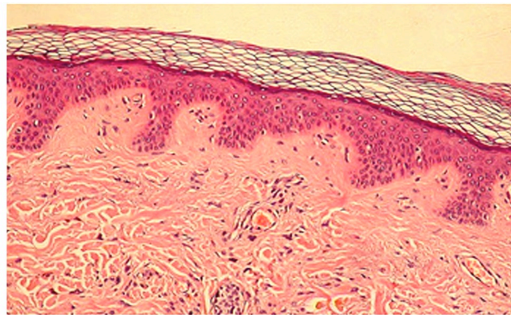


Fig. 3.2 Tejido epitelial estratificado y córneo (piel)

Este cambio de microambiente favorece la migración, expansión y proliferación de células no especializadas, y no la expresión de funciones diferenciadas. El microambiente del cultivo puede estar influenciado por la naturaleza del sustrato (sólido, semisólido o líquido), el contacto con otras células, la constitución del medio y la temperatura.

Adhesión celular

La mayoría de las células en cultivo, provenientes de tejidos sólidos, crecen en monocapa, adheridas a una superficie, y después de subcultivar (transferir células de un recipiente de cultivo a otro), requieren volver a adherirse al sustrato antes de proliferar. A su vez, antes de adherirse deben secretar proteínas de MEC y proteoglicanos. Las células cuentan con receptores de superficie específicos para moléculas en la MEC. En general, las células epiteliales además de la adhesión a la superficie, son muy dependientes de las adhesiones intercelulares, por ello, cuando son subcultivadas a baja densidad crecen en parches, pues les permite formar uniones célula-célula.

Hay 3 principales clases de proteínas transmembranales de adhesión:

- a) CAMs (*cell-cell adhesion molecules*, calcio independientes) y cadherinas (calcio dependientes, Figura 3.3). Ambas participan en interacciones entre células homólogas.
- b) Integrinas. Participan en interacciones célula-sustrato (por ejemplo, receptores para fibronectina, laminina, colágeno). Son heterodímeros (subunidad alfa y beta) y su dominio extracelular es muy polimórfico.

c) Proteoglicanos. Participan en interacciones célula-sustrato a través de dominios diferentes a las integrinas. Pueden ser receptores de factores de crecimiento de baja afinidad y pueden estabilizar o translocar al factor a su receptor de alta afinidad.

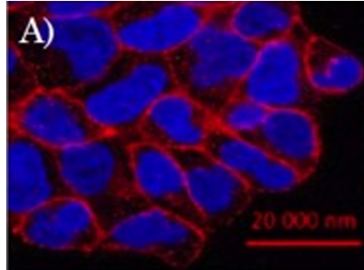


Fig. 3.3 Inmunofluorescencia que muestra la localización de cadherina (en rojo) en la membrana de células T47D de adenocarcinoma de mama. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (en azul). Amplificación 100X

Las proteínas transmembranales de adhesión son el motivo por el cual, para subcultivar células en monocapa, se requiera de proteasas que puedan digerir MEC y algún grado de dominios extracelulares de proteínas de adhesión. Esto explica el por qué los epitelios suelen ser más resistentes al tratamiento con proteasas (tienen más moléculas de adhesión, como uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas). Además de las proteasas, se suele agregar un agente quelante, como el EDTA, porque muchas de estas moléculas de adhesión dependen de calcio.

Las uniones intercelulares tienen diferentes funciones:

- a) Función mecánica (desmosomas y uniones adherentes). Mantienen a las células epiteliales juntas, éstas crecen confluentes en cultivo y van incrementando el número de desmosomas, por lo que luego es difícil desagregarlas.
- b) Función de sellado (uniones estrechas). Sellan el espacio entre células epiteliales, por ejemplo, entre células secretoras en un acino o ducto o entre células endoteliales.
- c) Función comunicante (*gap junctions*). Permiten que iones, nutrientes y moléculas señalizadoras pasen entre las células en contacto.

En los espacios intercelulares encontramos a la MEC, su constitución depende del tipo celular y a su vez, esa composición regula el fenotipo celular. Los fibroblastos secretan principalmente colágeno tipo 1 y fibronectina, mientras que los epitelios producen laminina en mayor proporción. La complejidad de la MEC es un componente significativo en la expresión del fenotipo de las células unidas a él (y en los tejidos, hay una mezcla de tipos celulares). Las líneas celulares en cultivo generan su propia MEC, pero los cultivos

primarios, la propagación de algunas células especializadas y la inducción de su diferenciación, puede requerir provisión exógena de MEC (como colágena, laminina, fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos, matrigel[®], etc.)

La importancia de la MEC radica en que permite la unión necesaria para que ocurra la proliferación celular y se lleve a cabo la proliferación. Además, la interacción con ella es necesaria para la expresión de algunas funciones especializadas de las células. Su uso en el cultivo celular puede ser muy benéfico para incrementar proliferación, supervivencia o diferenciación.

Otro componente importante en las adhesiones intercelulares y célula-sustrato, es el citoesqueleto, pues las moléculas de adhesión se unen a él. La unión de integrinas a microfilamentos de actina se asocia con señalización recíproca entre superficie celular y núcleo. Las cadherinas también se unen a actina en uniones adherentes, mediando cambios en la forma celular. Los desmosomas emplean cadherinas, pero se unen a los filamentos intermedios (como las citoqueratinas), los cuales son específicos de linaje celular y pueden ser usados para caracterizarlos. Los microtúbulos se asocian principalmente a motilidad y tráfico intracelular de organelos.

Las células en cultivo se pueden mover en el sustrato y las más móviles son los fibroblastos a baja densidad (es decir, cuando no están en contacto), mientras que las menos móviles son las monocapas epiteliales densas. Los fibroblastos migran con polaridad (*lamellipodio* en el borde líder, fibras de estrés en el polo posterior para retraer, pero la migración es errática. La inhibición por contacto es el cese de movimiento en la confluencia, cuando toda el área de crecimiento disponible se utiliza y las células hacen contacto cercano una con la otra. La inhibición por contacto se acompaña de reducción en los *ruffles* de membrana y eventualmente lleva a cese de ciclo celular.

Las células epiteliales, a menos que estén transformadas, no muestran migración aleatoria ni se polarizan, sino que migran hasta hacer contacto con otra célula y eventualmente se acumulan en parches.

Proliferación y diferenciación celular

Cuando se realizan cultivos celulares, es importante recordar las 4 fases del ciclo celular: G1, S, G2 y M. La progresión a través de estas fases es controlada por ciclinas y regulada a

través de puntos de control, en los que participan proteínas supresoras de tumores como p53 y Rb. Cuando las células detectan un daño en los puntos de control que no les es posible reparar, recurren a la muerte celular por apoptosis.

De especial importancia es recordar que en la fase G1 la célula progresa a la síntesis de ADN (fase S), o bien, sale del ciclo celular para comprometerse a la diferenciación. Tanto la baja densidad celular como la presencia de factores de crecimiento mitogénicos, promueven la entrada al ciclo celular, mientras que la alta densidad inhibe la proliferación de células normales. La expresión de propiedades de diferenciación en los cultivos celulares es limitada por la promoción de la proliferación celular, que es necesaria para la propagación de la línea celular y expansión de *stocks*, es decir, su inducción es antagónica de la proliferación. Las condiciones para la inducción de diferenciación son: alta densidad celular, incremento en las interacciones célula-célula y célula-matriz y presencia de factores de diferenciación. Si la diferenciación se requiere en algún momento de un cultivo celular, puede ser necesario definir 2 distintos grupos de condiciones: uno para proliferación y otro para diferenciación.

En los casos en que se desea mantener la diferenciación de un cultivo, no se debe olvidar el uso de medios selectivos apropiados, con inductores de diferenciación y usualmente libres de suero. Es conocido que las funciones específicas se retienen más tiempo cuando la estructura tridimensional del tejido se mantiene, como en un cultivo de órgano. Desafortunadamente, los cultivos de órganos no pueden ser propagados, se deben preparar *de novo* en cada experimento y es más difícil cuantificar el número de células empleadas en cada experimento. Una alternativa es el uso de andamios para recrear la estructura tridimensional, por ejemplo, con matrices de geles de colágeno, celulosa o esponjas de gelatina. Aunque tienen limitaciones, cuentan con la posibilidad de introducir interacciones heterotípicas.

Históricamente, la inhabilidad de las primeras líneas celulares para expresar características fenotípicas propias del órgano de origen, se tomó como sinónimo de dediferenciación. Según este concepto, las células diferenciadas pierden sus propiedades especializadas cuando se cultivan *in vitro*. Ahora se sabe que en muchas ocasiones esto se debía a que los cultivos carecían de agentes inductores específicos, lo que causaba la pérdida, potencialmente reversible, de propiedades diferenciadas (fenómeno conocido como

desadaptación). Aunado a lo anterior, solía ocurrir que al realizarse el aislamiento a partir del órgano, las células no diferenciadas sobrepasaban a las diferenciadas, de reducida capacidad proliferativa. En las correctas condiciones de cultivo, las funciones diferenciadas pueden ser re-expresadas.

Señalización celular

En condiciones fisiológicas, las células están bajo la influencia constante de señales que llegan vía vasculatura sistémica, o bien, que difunden de células adyacentes. Estas señales moleculares se clasifican en:

a) Moléculas de adhesión

b) Factores solubles

- Parácrino (homotípico cuando la señal molecular interactúa con el mismo tipo de célula que liberó la señal o heterotípico cuando las señales vienen de diferente tipo celular de las que responderán)
- Endócrino
- Autócrino

En cultivos *in vitro* sólo se puede contar con las señales autócrinas y parácrinas homotípicas. Esta puede ser la razón por la cual algunos tipos celulares fracasan en adherirse cuando se cultivan a bajas densidades (dilución de factores autócrinos y homotípicos). Para subcultivar esas células, puede ser necesario el uso de medios condicionados, que consiste en utilizar medio “fresco” mezclado con medio “usado”. En los casos del mantenimiento y proliferación de células especializadas y la inducción de diferenciación, que pueden depender de factores endócrinos o parácrinos, éstos deben identificarse y agregarse al medio de cultivo.

Iniciación de un cultivo celular

Todo cultivo celular inicia con un cultivo primario, éste se obtiene ya sea por la propagación de células que migraron de un fragmento de tejido o por la dispersión enzimática o mecánica de un tejido, como se explica ampliamente en el capítulo 10 de este libro. Independientemente del método empleado, el cultivo primario es el inicio de una

serie de procesos selectivos que pueden dar lugar en última instancia a una línea celular relativamente uniforme.

Un cultivo primario está constituido por células seleccionadas con base a su capacidad para migrar de un fragmento de tejido, o bien, a su capacidad para sobrevivir a la técnica de disgregación y adherirse al sustrato. Si el cultivo dura más de unas horas, aparece la selección por la capacidad de proliferación. Un cultivo primario es muy inestable, pues las células que lo constituyen se están modificando continuamente para adaptarse, por lo que no son poblaciones homogéneas.

Después de alcanzar la confluencia, las células cuyo crecimiento es sensible a la inhibición por contacto dejarán de dividirse, mientras que cualquier célula que haya sufrido transformación (insensibles a la limitación por densidad) tenderá a proliferar más. Mantener la densidad celular baja (por ejemplo, mediante subcultivos frecuentes) ayuda a preservar el fenotipo normal. Algunas funciones especializadas se expresan fuertemente en el cultivo primario, particularmente cuando llega a la confluencia, y en ese momento ocurre la semejanza morfológica más cercana al tejido progenitor.

Evolución de los cultivos celulares

Una vez que las células del cultivo primario llenan el recipiente donde estaban creciendo, se realiza un “pase”, también llamado primer subcultivo, que consiste en tomar una muestra de esas células y ponerlas a crecer en otro recipiente, como se explica en el capítulo 11 de este libro. En ese momento, el cultivo primario cambia de nombre y ahora es conocido como línea finita. Los cultivos evolucionan siguiendo un comportamiento como el de la figura 3.4, en donde podemos ver que con cada subcultivo sucesivo, las células se seleccionan en base a la habilidad para proliferar más rápidamente. Al tercer pase, la población celular es más estable. En presencia de suero y ausencia de condiciones de selección específicas, las células mesenquimatosas derivadas del tejido conectivo predominan. Este sobrecrecimiento de células mesenquimatosas es uno de los principales retos del cultivo de tejidos.

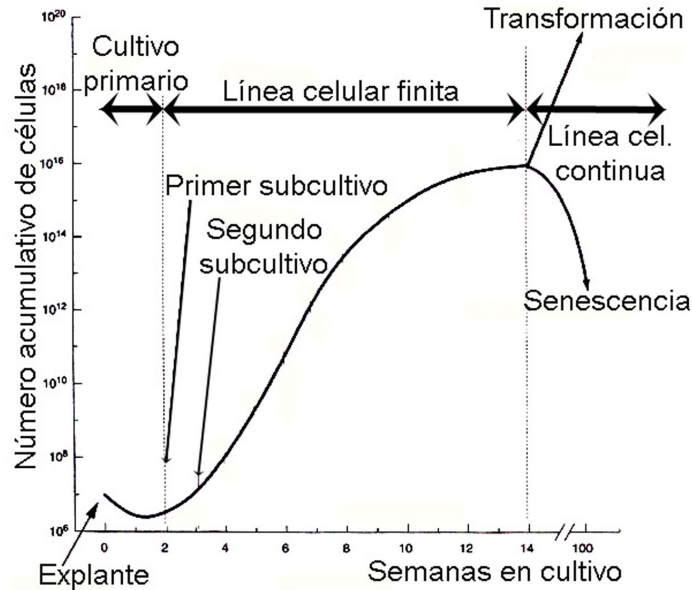


Fig. 3.4 Evolución de las líneas celulares

Las células derivadas de tejido normal mueren después de un número fijo de doblaje poblacional, evento genéticamente determinado y conocido como senescencia. La senescencia puede ocurrir en cualquier momento: en los fibroblastos diploides humanos ocurre entre los 30 a 60 doblajes celulares (aproximadamente 10 a 20 semanas de cultivo).

Desarrollo de líneas celulares continuas

Algunas líneas celulares finitas pueden dar lugar a líneas celulares continuas. Una línea celular continua en general aparece alrededor de la semana 14 de cultivo (Figura 5), pero puede ocurrir en cualquier momento. La capacidad de una línea celular de proliferar continuamente probablemente refleja su capacidad de variación genética. La variación genética implica a menudo la sobreexpresión del gen de la telomerasa y la eliminación o mutación del gen p53, que normalmente detiene la progresión del ciclo celular cuando el ADN está dañado. Una característica común de muchas líneas celulares continuas de humano es el desarrollo de un número de cromosomas subtetraploide. La alteración de un cultivo que da lugar a una línea celular continua se denomina comúnmente transformación *in vitro* y puede ocurrir de forma espontánea o ser inducida química o viralmente. En cultivo celular, la “inmortalización” significa la adquisición de un tiempo de vida infinito y la “transformación” implica una alteración adicional en las características de crecimiento

(independencia de anclaje y pérdida de inhibición por contacto) que a menudo, pero no necesariamente, se correlacionan con la tumorigenicidad.

Las líneas celulares continuas suelen ser aneuploides y con frecuencia tienen un número cromosómico entre los valores diploides y tetraploides. Hay una variación considerable en el número de cromosomas entre las células de la población (heteroploidía).

Actividades sugeridas

- Realizar un dibujo científico de una célula eucarionte.
- Observar videos sobre motilidad celular y sobre la inhibición por contacto:

Pushing with the lamellipodium cellix.imba.oeaw.ac.at

http://cellix.imba.oeaw.ac.at/fileadmin/conferences/Videotour_CellMotility/Figura7a.mov

http://www.4shared.com/video/OWK82Thv/2002_inhibicin_por_contacto.html

Observar y comentar en clase un video sobre la dinámica celular:

http://multimedia.mcb.harvard.edu/anim_innerlife_Hi.html

- Observar al microscopio óptico de luz, diferentes preparaciones de tejido humano.

Bibliografía

Freshney RI. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/cien_a_culitvos.pdf

4. Laboratorio de cultivo celular

Objetivo

- Que el alumno sea capaz de identificar y conocer la utilidad de diferentes equipos utilizados en un laboratorio de cultivo celular.

Contenido

Los equipos necesarios en un laboratorio de cultivo celular dependen de la aplicación particular que se le dé al cultivo, el ahorro de tiempo que el equipo podría producir, la calidad necesaria de los datos a procesar, los requisitos de la muestra, el ahorro de tiempo y personal, el número de personas que utilicen el equipo, el presupuesto disponible y las necesidades especiales de los experimentos a realizar. A continuación se mencionan brevemente 5 equipos que suelen ser necesarios en todo laboratorio de cultivo celular: campanas de flujo laminar, incubadoras, microscopios, centrifugas y autoclaves.

Campanas de flujo laminar

Son cámaras de circulación forzada que según su diseño y especificaciones, proporcionan un área libre de partículas o de probables contaminantes que puedan alterar el producto con el cual se trabaja, afectar la salud del usuario o contaminar al medio ambiente. El flujo laminar se consiguen mediante un motor ventilador de impulsión de aire controlado, un distribuidor de aire y un filtro absoluto o HEPA (*High Efficiency Particulate Air*), que determina la pureza y la laminaridad del aire. Las campanas de flujo se clasifican según el nivel y tipo de protección en clase I, II y III (Figura 4.1).

a) Clase I. La campana de gases (o vitrina extractora de gases) es una cámara que captura los humos y vapores procedentes de la manipulación de los productos químicos en el laboratorio.

b) Clase II. Son cámaras que emplean un ventilador para forzar el paso del aire a través de un filtro HEPA, para proporcionar un volumen constante de aire limpio que fluye a una velocidad uniforme y laminar en la superficie de trabajo.

c) Clase III. Son cámaras diseñadas para limitar al máximo el riesgo del personal de laboratorio expuesto a agentes potencialmente riesgosos.

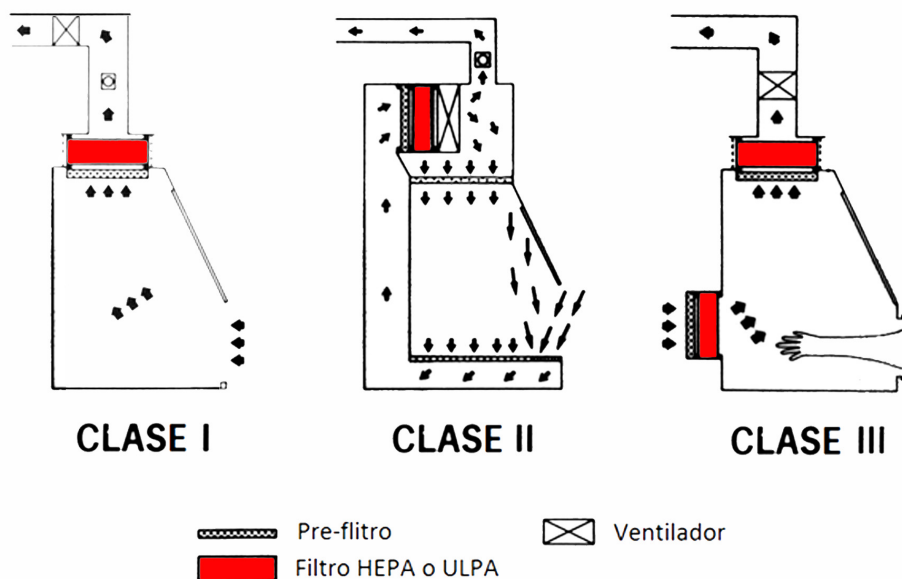


Fig. 4.1 Clasificación de las campanas de flujo

Las campanas de flujo deben situarse lo más lejos posible de las rejillas de aire acondicionado, campanas de gases, puertas y zonas de mucho tránsito de personas. Debe existir al menos 0.3 m entre la salida de aire de la cabina y el techo del laboratorio. El aire expulsado debe canalizarse al exterior siempre que se manipulen marcadores radioactivos o fármacos citotóxicos.

Debe encenderse con al menos 3 minutos de anticipación antes de su uso, a fin de purgar los filtros y limpiar la zona de trabajo. Después, se debe limpiar la superficie de trabajo con alcohol etílico al 70% o equivalente. Es aconsejable descontaminar el exterior de todo el material que sea necesario introducir en la cabina (Figura 4.2). No debe utilizarse el mechero Bunsen dentro de la cabina, porque su flama crea turbulencias en el flujo de aire y además puede dañar el filtro. Al finalizar el trabajo, la cabina se debe vaciar por completo de cualquier material, limpiar y descontaminar la superficie de trabajo con alcohol etílico al 70% o equivalente y dejar en marcha la cabina durante al menos 3 minutos.

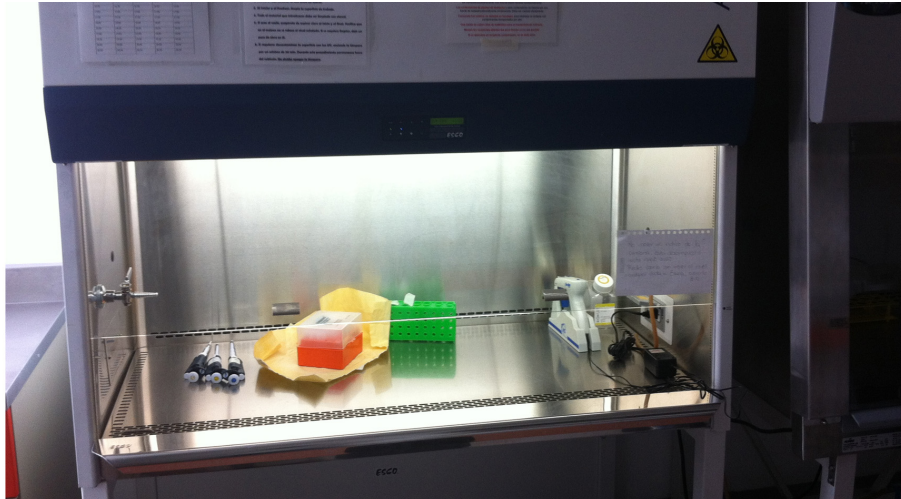


Fig. 4.2 Área típica de trabajo dentro de una campana clase II

Incubadoras

Son cámaras con ambiente controlado, cuyo propósito es conservar organismos vivos en un entorno que resulte adecuado para su crecimiento. El ambiente controlado se logra con un sistema de resistencias eléctricas que se regulan mediante dispositivos como termostatos o controles microprocesados. Los sistemas de transferencia de calor utilizan la conducción y la convección natural o forzada (Figura 4.3).

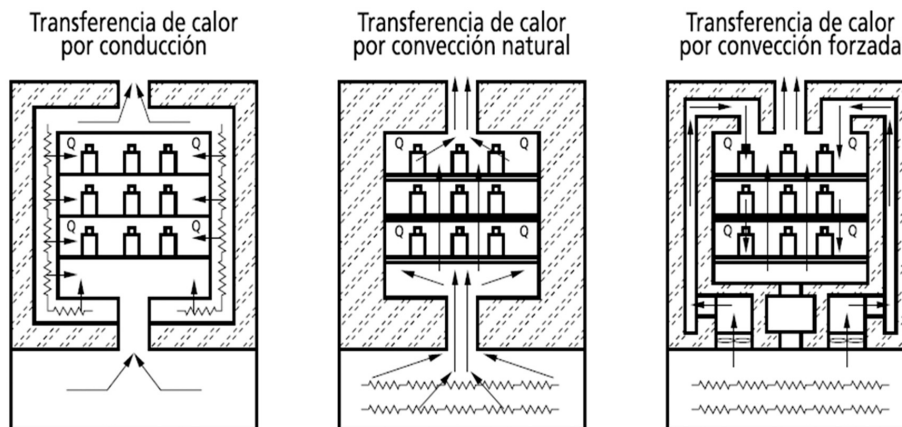


Fig. 4.3 Sistemas de transferencia de calor

Las incubadoras se pueden clasificar de acuerdo a la temperatura a la cual operan (intervalo de -10°C a 75°C), la composición atmosférica utilizada (los cultivos hipóxicos son aquellos con 1% a 2% de O_2 y los hiperóxicos con 50% a 90% de O_2 ; también las hay con inyección de gases como CO_2 y N_2), si tienen o no agitación, el tipo de chaqueta empleada

(para distribuir el calor en la cámara, las hay con chaqueta de agua o de aire) y el tipo de ambiente (húmedo o seco). La mayoría de las células de mamífero en cultivo, que crecen en monocapa, requieren una incubadora sin agitación, con 5% de CO₂, a 37° C y con ambiente húmedo.

Microscopios

Se pueden clasificar en estereoscópicos y compuestos. Los estereoscópicos amplifican de 5 a 50 veces las imágenes mediante la utilización de una o más lentes convergentes en un solo sistema óptico y se utilizan para disectar tejidos (Figura 4.4).

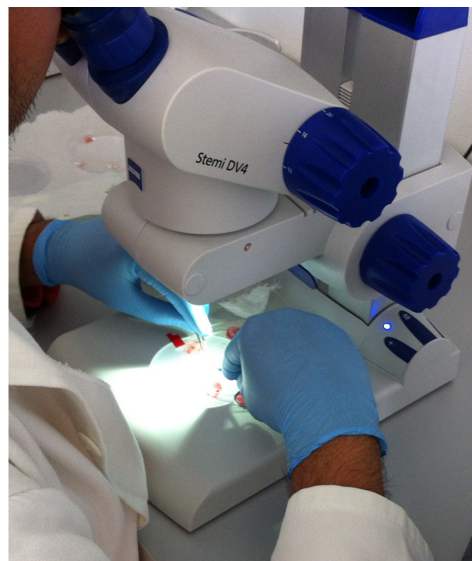


Fig. 4.4 Microscopio estereoscópico

Los microscopios compuestos se denominan así porque la imagen se forma mediante la utilización de tres sistemas de lentes, el condensador, los objetivos y el ocular (Figura 4.5).

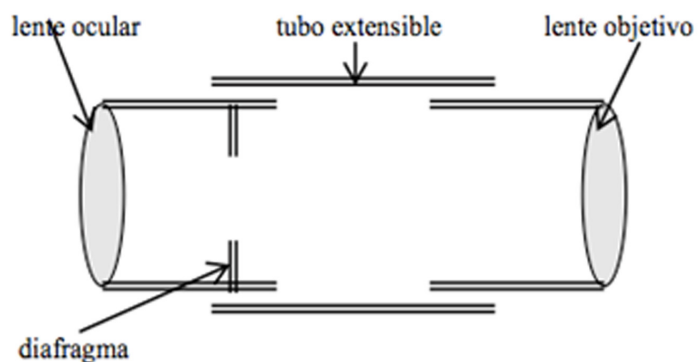


Fig. 4.5 Esquema de los lentes en un microscopio compuesto

Existe una gran variedad de microscopios compuestos; los que suelen usarse rutinariamente para examinar los cultivos celulares son los microscopios invertidos (Figura 4.6).



Fig. 4.6 Microscopio invertido

Centrífugas

La centrifugación es el método más rápido, cómodo y limpio para separar un sólido en suspensión con un líquido. Consiste en aplicar una cierta velocidad angular a la suspensión, de forma que las partículas más pesadas se depositen en el fondo del recipiente (precipitado), mientras que las sustancias más ligeras quedan por encima (sobrenadante). La condición previa para que esta separación ocurra es una diferencia de densidad lo suficientemente grande entre los componentes (Figura 4.7). La fuerza centrífuga generada por estos equipos se puede expresar como revoluciones por minuto (rpm) o como fuerza centrífuga relativa (g).

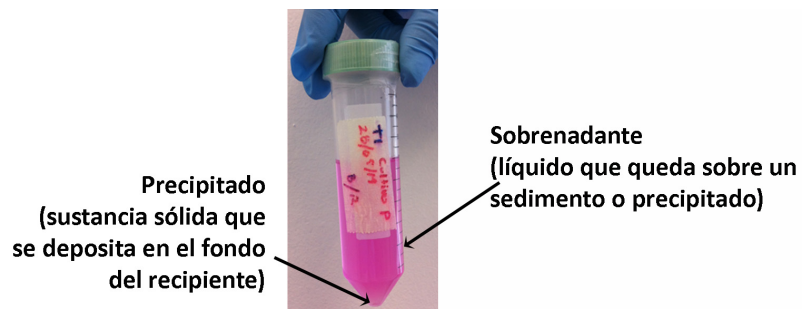


Fig. 4.7 Suspensión sometida a centrifugación

Las centrifugas se usan rutinariamente para obtener suero o plasma a partir de sangre total (con 1,000 g durante 10 min), concentrar células de líquidos que tengan un bajo número (con 1,000 a 5,000 rpm durante 5 min) o separar fases cuando se usan técnicas en las cuales se utilizan disolventes orgánicos (con 13,000 rpm durante 10 min). La centrifuga refrigerada a 4° C se utiliza en el laboratorio de cultivo celular principalmente para separar las células del medio de cultivo o *buffer* de lavado en una suspensión celular. La velocidad no puede ser muy elevada ya que las células podrían lisarse; por otro lado, el aumento de fuerza de gravedad en el proceso de centrifugación induce un aumento de calor en la suspensión celular que también podría dañarlas. Al ser un equipo refrigerado, debe situarse alejado de las campanas de flujo laminar y las incubadoras, para evitar que las corrientes de aire caliente que genera el proceso de refrigeración puedan contaminar la zona de cultivo. Toda centrifuga requiere cuidados y precauciones generales, por ejemplo, los rotores deben mantenerse limpios y libres de residuos, para eliminar potenciales fuentes de contaminación o desequilibrio en el eje de giro. Los tubos que se utilicen deben resistir la fuerza centrífuga que se aplique y su colocación debe ser de forma equilibrada, es decir, igual peso en posición opuesta dentro de la centrifuga (Figura 4.8).

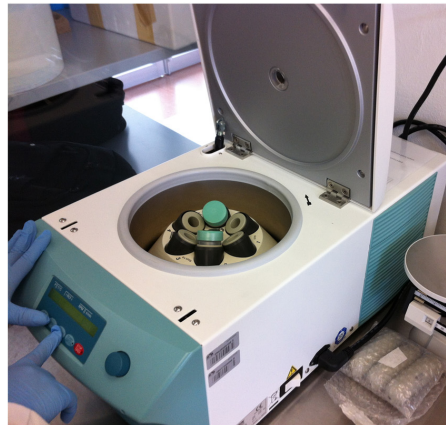


Fig. 4.8 Centrifuga refrigerada con recipientes balanceados

Autoclaves

Son recipientes de cierre hermético, que permiten trabajar a alta presión para realizar una esterilización con vapor de agua (Figura 4.9). Un ciclo de esterilizado “estándar” dura 15 a 20 min a 121° C, con presión interna de 103 kPa. Según su sistema de operación, se clasifican en manuales, semiautomáticas y automáticas. Algunas recomendaciones prácticas

para esterilizar usando un autoclave, son las siguientes: comprobar el nivel de agua destilada, las botellas no deben tener tapón o deben estar desenroscadas, evitar que las botellas se toquen y colocar cinta testigo al material a esterilizar. Por seguridad, nunca abrir un autoclave a menos que el manómetro indique cero.

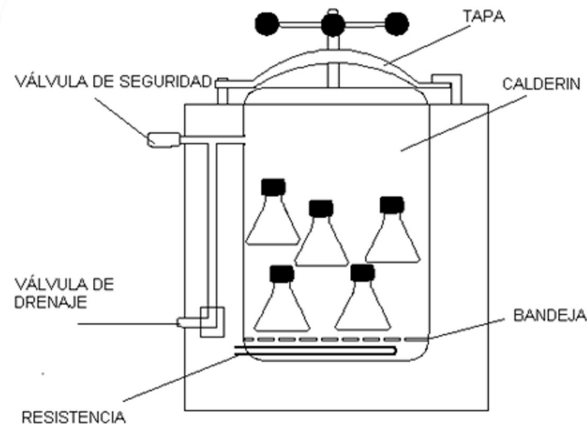


Fig. 4.9 Esquema de un autoclave

Actividades sugeridas

➤ Realizar una visita al laboratorio de cultivo celular para conocer los diferentes equipos utilizados rutinariamente.

➤ Observar un video introductorio sobre el cultivo celular (Video 1: *Introduction to Cell Culture*):

<http://es-mx.invitrogen.com/site/mx/es/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>

➤ Organizar exposiciones orales sobre los equipos más utilizados en cultivo celular (centrífugas, autoclaves, microscopios, campanas de bioseguridad e incubadoras de CO₂).

➤ Investigar el fundamento óptico del por qué no es posible visualizar células con un microscopio invertido si éstas están cultivadas en cajas multipozos.

Bibliografía

Freshney RI. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

5. Técnica aséptica

Objetivos

- Que el alumno entienda la importancia de mantener una técnica aséptica en el laboratorio de cultivos celulares para evitar contaminación.
- Conocer las técnicas asépticas utilizadas en un cuarto de cultivos para evitar contaminación.

Contenido

La técnica aséptica ayudar a eliminar la contaminación mediante el establecimiento de un código de práctica estricto, asegurándose de que todos utilicen las instalaciones apegados a los lineamientos.

La contaminación por microorganismos es un problema muy importante en los cultivos celulares. Pueden ser por bacterias, esporas fúngicas, levaduras y micoplasma.

Definiciones importantes

- Asepsia: sin infección o contaminación. Ausencia absoluta de gérmenes. Conjunto de procedimientos o maniobras para evitar la contaminación. Exclusión continua de microorganismos contaminantes (Figura 5.1).
- Esterilización: conjunto de procedimientos que destruyen los gérmenes, impiden su desarrollo y evitan contaminación. Eliminación de toda forma de vida de un material o medio.
- Desinfección: conjunto de procedimientos para destruir o eliminar agentes contaminantes de todo lo que no pueda esterilizarse (mobiliario). Destrucción de cualquier organismo vivo que pueda causar daño particular o infección (Figura 5.1).
- Antisepsia: maniobras que se aplican a la piel, mucosas y manos del personal, el cual debe usar guantes (Figura 5.1).



Fig. 5.1 Procedimientos de asepsia, desinfección y antisepsia

¿Cómo evitar la contaminación masiva?

- Checar cuidadosamente los cultivos visualmente y al microscopio invertido
- Mantener los cultivos libres de antibióticos para poder evidenciar contaminaciones ocultas.
- Verificar la esterilidad de los reactivos antes de usarlos.
- No compartir medios o reactivos con otros usuarios.
- No usar los frascos de medio u otro reactivo para diferentes líneas celulares.
- Mantener el estándar de esterilidad todo el tiempo.

Técnica aséptica

Combinación de procedimientos diseñados para reducir la probabilidad de infección. Las causas de contaminación son multifactoriales y las soluciones no son simples ni obvias. En esos casos hay que continuar con los cuidados, así será más fácil identificar la fuente de contaminación.

Elementos del ambiente aséptico

- Área tranquila

Si no se tiene una campana de flujo laminar, se necesita un cuarto estéril o por lo menos un espacio tranquilo con poco movimiento de personal.

Si se tiene flujo laminar, debe estar libre de corrientes de aire de puertas y ventanas. No debe tener cerca equipo que genere corrientes de aire, como centrífugas, refrigeradores, congeladores.

- Superficie de trabajo

La superficie de trabajo debe estar limpia y ordenada. Hay que limpiarla con alcohol al 70%. Sólo colocar en la mesa el material para utilizar en el procedimiento. Tener una superficie de trabajo al centro, libre de equipos y cosas que puedan contaminar. Si algo se derrama, hay que limpiarlo inmediatamente con alcohol.

- Higiene personal

Las manos deben lavarse frecuentemente. Usar guantes quirúrgicos cuando haya riesgo o peligro. De acuerdo a la Food and Drug Administration (FDA), para Good manufacturing Practices (GMP) es necesario usar gorro, cubrebocas y ropa quirúrgica. No es necesario si se tiene campana de flujo laminar, pero se debe usar bata y recoger el cabello.

- Reactivos y medio

Limpiar las superficies externas con alcohol. Hay que quitar las envolturas antes de colocar los frascos en la campana.

- Cultivos

Si vienen de otros laboratorios hay un alto riesgo de que estén contaminados ya sea por su fuente o por el tránsito.

A continuación se enlistan los aspectos que se deben considerar para el trabajo en el laboratorio de cultivos celulares para reducir el riesgo de contaminación.

Pasos para reducir problemas de contaminación

1. Usa frascos de cultivo sellados siempre que sea posible, especialmente para cultivos por largo tiempo.
2. Evita verter medio de cultivo, en su lugar, usa pipetas. Si no se puede evitar verter, usa gasa estéril para eliminar el medio de cultivo que haya quedado en el cuello del frasco.
3. No uses la campana como área de almacenamiento: las cajas, botellas, etc., además de agregar carga microbiana, alteran el patrón laminar del aire.

4. Usa bata de laboratorio limpia para proteger el cultivo de contaminantes provenientes de la piel o de la ropa. Su uso debe ser restringido al área de cultivo celular.
5. Trabaja en la campana sólo con una línea celular a la vez. Para evitar posibles contaminaciones entrecruzadas, usa recipientes separados de medios para cada línea celular. Usa desinfectante para limpiar la superficie de trabajo entre líneas celulares.
6. Transporta tus cultivos no sellados en bandejas, para minimizar el contacto con contaminantes transportados por aire.
7. Usa medio de cultivo libre de antibiótico para el mantenimiento rutinario.
8. Mantén los recipientes abiertos tan poco tiempo como sea posible.
9. Haz alícuotas de soluciones estériles con volúmenes pequeños para reducir el número de veces que debe ser abierto.
10. Deja el flujo laminar encendido durante el día. Apágalo sólo cuando no sea usado por periodos extensos.
11. Si se descubre un recipiente contaminado no se debe abrir.
12. Reduce los accidentes marcando cuidadosamente los cultivos y las soluciones. Indica si han sido esterilizados.
13. Mantén el área limpia

Las incubadoras, especialmente aquellas que mantienen altos niveles de humedad, requieren limpieza periódica y desinfección. El agua de los baños usados para atemperar los medios o inactivar los sueros debe ser cambiada periódicamente. Los frascos deben secarse cuidadosamente antes de usarse. Los contenedores de pipetas de deshecho y otros contenedores de basura son una fuente de material potencialmente contaminado. Debe ser vaciado diariamente.

Actividades sugeridas

➤ Realizar una visita al laboratorio de cultivo celular para conocer los diferentes equipos utilizados y el material con el que se trabaja.

Bibliografía

Freshney RI. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

6. Preparación y esterilización

Objetivos

- Que el alumno conozca los pasos a seguir para realizar un buen uso del cuarto de cultivo y prepare todo lo necesario antes de empezar a trabajar.
- Que el alumno identifique los diferentes métodos de esterilización y cuál debe utilizar para cada cosa que utiliza en el cuarto de cultivos.

Contenido

Para aislar un microorganismo de un proceso infeccioso, es necesario inocularlo en un sistema estéril.

Antes de la realización de un cultivo celular se debe llevar a cabo lo siguiente:

- Preparación de Medios de Cultivo.
- Esterilización de Medios y Reactivos.
- Lavado, esterilización y preparación de materiales.

Esterilidad

Todo el material que esté en contacto con el cultivo debe estar estéril (Figura 6.1).

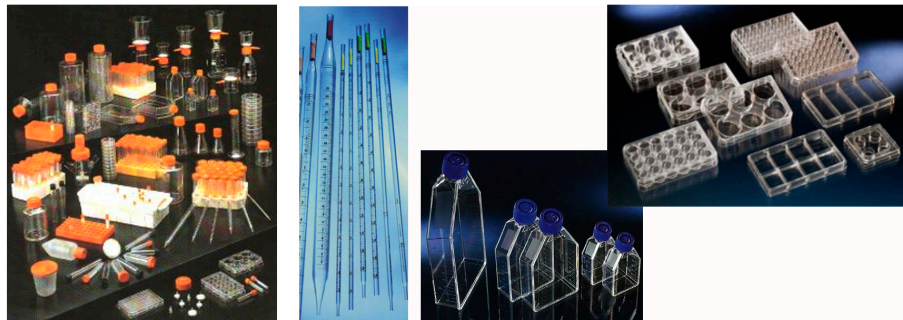


Fig. 6.1 Material que debe usarse estéril

La manipulación del cultivo debe realizarse de tal forma que se evite el contacto con zonas no estériles.

Manipulación estéril

- Limpiar la superficie de trabajo, frascos, matraces, y cajas que vengan de refrigeradores, incubadoras o baño maría.
- Tapar los frascos con rosca
- Flameado de pipeta, cuellos de botella y tapas antes y después de cerrarlos cuando no se cuente con campana de flujo laminar.

Métodos de esterilización

En general, tenemos 2 métodos de esterilización: físicos y químicos; y cada uno tiene formas o sustancias diferentes para esterilizar:

- Físicos

Calor: puede ser seco o húmedo. Dentro de las opciones de calor seco se encuentran la incineración, el flameado o el aire caliente (estufas). Dentro de las opciones de calor húmedo se encuentran las autoclaves y la tindalización (técnica de esterilización que consiste en elevar la temperatura del material que se quiere someter a tratamiento, entre 60 y 100 °C, varias veces seguidas a intervalos de 24 horas. Con lo cual se consigue la destrucción de los microorganismos sin alterar la composición química del material).

Radiaciones ionizantes: Se utilizan para elementos que no soportan el calor y la humedad (jeringas, catéter, materiales médicos y de origen biológico: medicamentos, alimentos).

Principalmente se utilizan las radiaciones gamma con cobalto 60 ya que son eficientes y seguras.

Filtración: La esterilización por filtración se logra por el paso de un líquido o un gas a través de un material capaz de retener los microorganismos presentes. Se emplea para materiales sensibles al calor, tales como ciertos medios de cultivo, azúcares, soluciones de antibióticos y otros medicamentos, etc. Hay varios tipos de filtros, entre ellos los que más se usan son los filtros de profundidad y los filtros de superficie o filtros de membrana.

- Químicos

Óxido de etileno: Se debe combinar con CO₂. Tiene gran poder de penetración. Es importante airear los elementos antes de ser utilizados ya que es tóxico y mutágeno.

Glutaraldehído: Se utiliza al 2% en solución acuosa. Bactericida, tuberculocida y viricida en 10 min. Tiene efecto esporicida pero necesita de 10 h a temperatura ambiente. Luego de su uso se deben enjuagar los elementos con abundante agua estéril. Se utiliza para objetos de plástico e instrumentos de cirugía y tejidos.

Formaldehído: Se utiliza para desinfección, pero debe ser utilizado con guantes y en laboratorios con campanas de nivel I. Uso muy restringido. Los materiales deben seguir el mismo tratamiento que para el óxido de etileno y el glutaraldehído.

Mecanismos de acción

- Alteración del DNA
 - Radiaciones (UV, ionizantes)
 - Alquilantes (glutaraldehído, formaldehído y óxido de etileno)
- Alteración de proteínas y enzimas
 - Calor; ácidos y álcalis
 - Oxidantes: peróxido de hidrógeno, Iodo
 - Metales pesados: mercurio
- Alteración de la membrana celular
 - Alcoholes
 - Fenoles
 - Agentes tensoactivos (amonios cuaternarios, jabones, detergentes)

Factores que afectan la potencia del desinfectante

- Tiempo: depende de la concentración del agente y del tipo de microorganismos a eliminar, pues no todas las bacterias mueren al mismo tiempo.
- Temperatura: normalmente al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Depende del agente para determinar su eficacia con el aumento de temperatura.

- pH: el cual afecta tanto a la carga superficial neta de la bacteria como al grado de ionización del agente. En general, las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas y por lo tanto, son más efectivos.
- Concentración del agente: a partir de la cual se obtendrá un efecto deseado. El rango de concentraciones en que se puede demostrar un efecto específico dependen del tipo químico del desinfectante, del método de ensayo del efecto, y del tipo de microorganismo a eliminar.
- Presencia de materia orgánica: como por ejemplo sangre, suero o pus, afecta negativamente la potencia de los desinfectantes de tipo oxidante y a los desnaturalizantes de proteínas, hasta el punto que pueden llegar a hacerlos inactivos en cuanto a su poder desinfectante y/o esterilizante.
- Características del microorganismo: como especie empleada, número de microorganismos iniciales, resistencia del microorganismo, entre otras.

Actividades sugeridas

- Realizar una visita al laboratorio de cultivo celular para conocer los diferentes equipos utilizados y el material con el que se trabaja.

Bibliografía

Freshney RI. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

Video: www.youtube.com/watch?v=ggpzNduZz_4

7. Recipientes de cultivo y sustratos

Objetivos

- Que el alumno reconozca los diferentes tipos de recipientes y sustratos que pueden ser utilizados en cultivo celular.
- Que el alumno sea capaz de explicar la naturaleza y propósito de los sustratos.

Contenido

Adhesión y crecimiento

La mayoría de las células de vertebrados cultivadas *in vitro* crecen en monocapas sobre un sustrato. Por ello, el sustrato debe permitir la adhesión celular, o por lo menos, permitir la adherencia de factores de unión producidos por las células para que a su vez, permitan la adhesión celular. A las células que requieren adherirse para proliferar se les llama “dependientes de anclaje”; las células transformadas frecuentemente se vuelven independientes de anclaje y pueden crecer en suspensión.

Materiales usados como sustrato

El vidrio fue usado originalmente por sus propiedades ópticas y la carga de su superficie. Es barato, fácil de lavar, esterilizable y ópticamente claro. Sin embargo, ha sido reemplazado en la mayoría de los laboratorios por plásticos sintéticos, porque tienen mayor consistencia y propiedades ópticas superiores. Ejemplos de plásticos sintéticos son el poliestireno, el PVC, el policarbonato, etc.

Los recipientes estériles de un solo uso, hechos de poliestireno, proporcionan un sustrato simple y reproducible para cultivo, por lo que son los más usados. La superficie es totalmente plana, así que las monocapas celulares quedan distribuidas uniformemente y son reproducibles. El poliestireno es hidrofóbico, no adecuado para adhesión celular, por eso debe recibir un tratamiento químico o con radiación γ , para producir una superficie con

carga y capaz de humedecerse. Como el tratamiento y su resultado pueden variar entre diferentes marcas comerciales, si se cambia de marca comercial se debe probar la eficiencia de crecimiento de las células en medio sin suero o en concentraciones subóptimas de éste (altas concentraciones de suero pueden enmascarar imperfecciones en el plástico).

Recipientes de cultivo

En la Tabla 7.1 se enlistan algunos recipientes de cultivo típicos. Las células HeLa (línea celular proveniente de carcinoma de cérvix) se utilizan como referencia para conocer el número esperado de células que puede contener cada recipiente (considerar sólo una quinta parte de ese número si se trata de una línea celular finita).

Recipiente de cultivo	mL	cm ²	No. de células aproximado (HeLa)
Cajas multipozos			
96 pozos	0.1	0.3	1 x 10 ⁵
6 pozos	2	10	2 x 10 ⁶
24 pozos	1	2	5 x 10 ⁵
Cajas Petri			
Diámetro 3.5 cm	2	8	2 x 10 ⁶
Diámetro 6 cm	5	21	5 x 10 ⁶
Diámetro 9 cm	10	49	1 x 10 ⁷
Frascos			
25 cm ² (T25)	5	25	5 x 10 ⁶
75 cm ² (T75)	25	75	2 x 10 ⁷

Tabla 7.1. Características de algunos recipientes de cultivo

Los factores que deben considerarse para elegir los recipientes de cultivo más adecuados para nuestro experimento son: la masa celular requerida, el tipo de crecimiento de las células (suspensión o monocapa), si se requiere un cultivo sellado o ventilado, la frecuencia del muestreo, el tipo de análisis y el costo.

En cultivos en monocapas, el número de células es proporcional al área de superficie disponible. La relación del volumen del medio y el número de células no es lineal: en los recipientes más pequeños se tiende a usar más medio del que proporcionalmente es usado en los recipientes grandes (Figura 7.1).

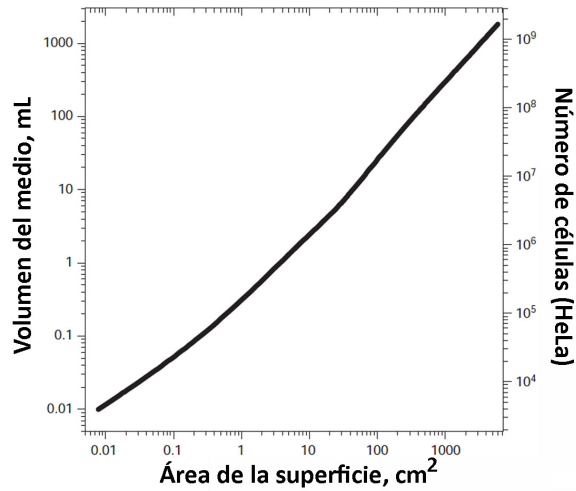


Fig. 7.1 Relación entre el volumen del medio, el número de células y la superficie de un recipiente de cultivo

Por ejemplo, si el ensayo a realizar requiere múltiples repeticiones, es preferible usar cajas multipozos que utilizan volúmenes pequeños (Figura 7.2 y 7.3)

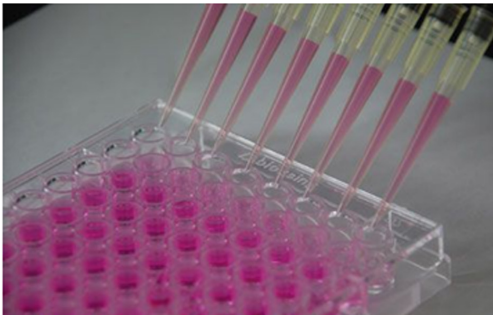


Fig. 7.2 Cajas de 96 pozos

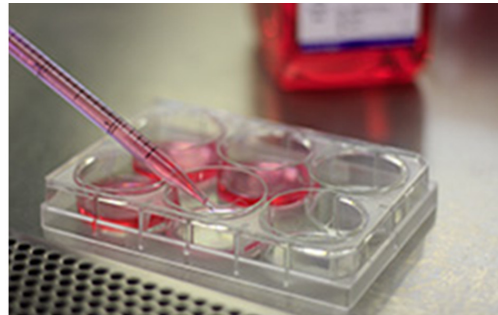


Fig. 7.3 Cajas de 6 pozos

Si no es el caso, se pueden usar cajas Petri o frascos (nombradas según su diámetro en mm o su área de superficie en cm², respectivamente, Figura 7.4 y 7.5).



Fig. 7.4 Cajas Petri para cultivo celular



Fig. 7.5 Frascos para cultivo celular

Si se requieren más células ($>1 \times 10^9$ células HeLa o su equivalente), se utilizan frascos multicapas (Figura 7.5, derecha). Si se requieren cantidades aún mayores de células, en vez de utilizar múltiples frascos multicapas cada vez más grandes, existen botellas especiales (*roller bottles*) (Figura 7.6).

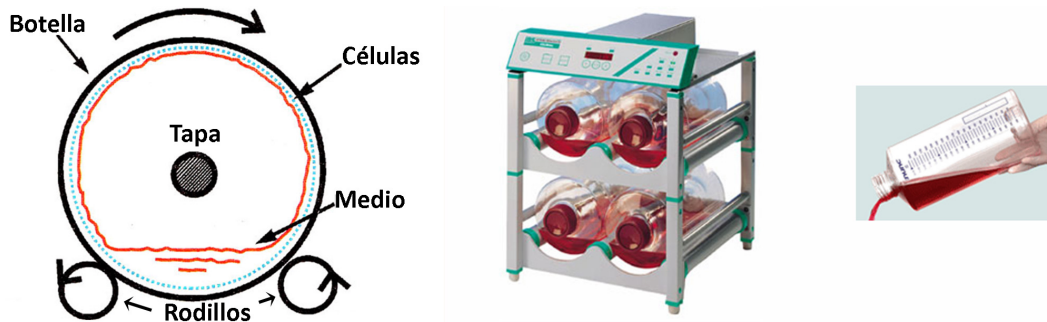


Fig. 7.6 Botellas para cultivo de células en monocapa

Si se trata de un cultivo en suspensión, para aumentar el número de células sólo se requiere aumentar el volumen del medio. Los cultivos en suspensión se mantienen en agitación (60 rpm) y el contenedor no requiere de tratamientos especiales para permitir adhesión celular.

En cuanto a la ventilación, los frascos de cultivo pueden tener tapas selladas, o bien, tapas ventiladas que permiten la difusión de CO_2 sin riesgo de contaminación. En las cajas multipozos y las cajas Petri sólo se pueden realizar cultivos no sellados.

Por otro lado, tomando en cuenta el tipo de muestreo y de análisis requerido, si las muestras se procesarán simultáneamente y de igual manera, se preferirán las cajas multipozos; en cambio, si se requieren ser retiradas a diferentes tiempos y procesadas inmediatamente, es mejor usar recipientes individuales. Si se requiere utilizar el microscopio de contraste de fases, se debe tener en cuenta que su uso se dificulta en cajas multipozos, porque el menisco que se forma es pequeño; también es difícil visualizar las células cultivadas en botellas de cultivo (*roller bottles*) porque a menudo se requiere quitar el condensador del microscopio. Finalmente, si el ensayo que se realizará sobre las células requiere solventes como acetona o tolueno, es necesario planear el cultivo sobre superficies de vidrio, pues los solventes pueden disolver el poliestireno.

Para evitar crecimiento desigual sobre la superficie de los recipientes, es importante evitar vibraciones, como las causadas por abrir y cerrar la incubadora frecuentemente o por vibración del equipo.

En lo que respecta al costo, en general las cajas Petri son menos caras que los frascos con equivalente área de superficie, pero los cultivos en cajas Petri son más dependientes del ambiente húmedo dentro de la incubadora y de las condiciones de CO₂ controladas, además de ser más propensos a contaminarse. La ventaja del cultivo en cajas Petri es que es más fácil de examinar al microscopio y de procesarse. El cultivo sobre superficies de vidrio es el más barato, pero su mayor desventaja es que su preparación es laboriosa, porque debe ser cuidadosamente lavado y esterilizado.

Superficies con matriz

La adhesión y el crecimiento celular pueden ser mejorados si se utilizan matrices. Esta es la razón por la cual el crecimiento celular mejora en las segundas siembras sobre un mismo sustrato, ya que permanecen adheridos a él las moléculas de la MEC secretadas por las primeras células sembradas. El mismo razonamiento aplica para el uso de los medios acondicionados, pues a veces contienen moléculas de la MEC. Es por ello que para algunos tipos celulares, se coloca sobre la superficie del recipiente algunas moléculas que puedan emular esta capacidad, como el colágeno, la gelatina o la poli-D-lisina (Figura 7.7). Como se mencionó antes, la función de la MEC no es sólo mecánica, sino que las adhesiones señalizan intracelularmente, por lo que no es de extrañar que en ocasiones, su uso permita la expresión de funciones diferenciadas.

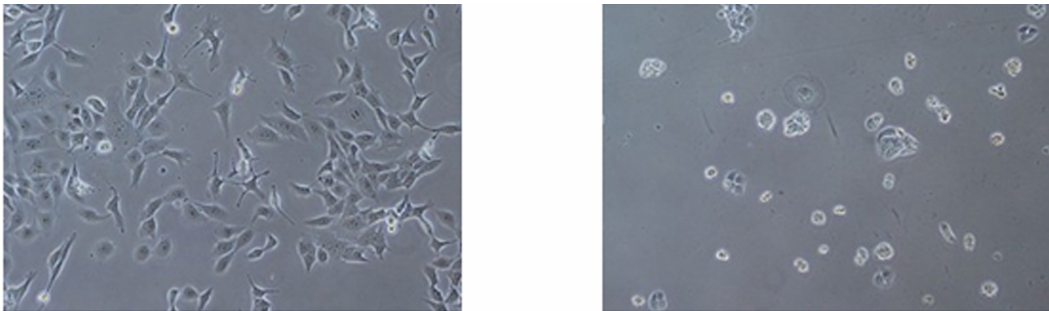


Fig. 7.7 Células sembradas sobre colágeno (izq.); mismas células sembradas sobre poliestireno (der.)

Hay preparaciones comerciales de MEC, como el Matrigel[®] (matriz preformada generada por una línea celular de sarcoma de ratón), que no están químicamente definidos, por lo que pueden tener incluso factores de crecimiento unidos.

En ocasiones, puede ser necesario una MEC producida por una monocapa de células que se adhieren fácilmente al plástico (por ejemplo, fibroblastos 3T3), para que otras células especializadas (por ejemplo, endoteliales) lo hagan. En estos casos, antes de sembrar a las células especializadas, se requiere remover los fibroblastos con un tratamiento de Tritón X-100. Especial mención merecen las células troncales (*stem cell*), que particularmente a bajas densidades, además de una MEC, requieren el soporte de células vivas, conocidas en inglés como *feeder layer* (Figura 7.8), para mantenerse por varios pases sin comprometer su pluripotencialidad.

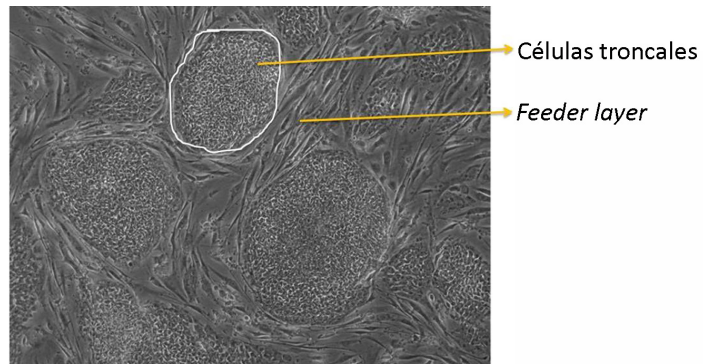


Fig. 7.8 Células troncales cultivadas sobre una capa de fibroblastos murinos inactivados

En ocasiones pueden ocurrir alteraciones morfológicas debidas al crecimiento sobre *feeder layers*, como se puede apreciar en la Figura 7.9.

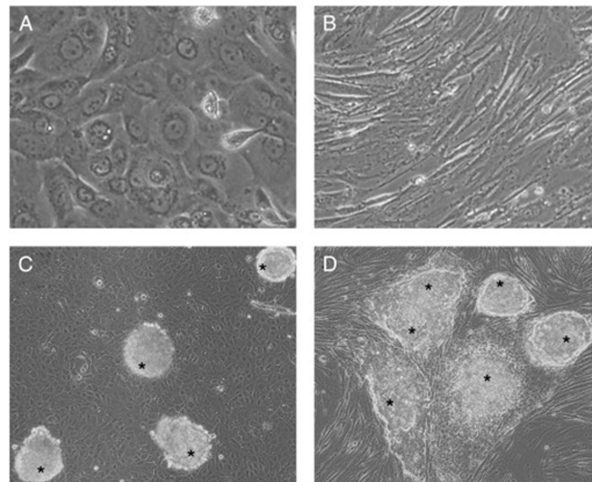


Fig. 7.9 Colonias de células troncales (estrellas) sobre diferentes *feeder layers*. 200x

En (A) se muestra la morfología de células endoteliales umbilicales y en (B) la morfología de fibroblastos murinos embrionarios, ambos utilizados como *feeder layers*. En (C) se observan células troncales cultivadas sobre las células endoteliales y en (D) las mismas células troncales pero cultivadas sobre los fibroblastos. Es fácil apreciar que las colonias de células troncales exhiben diferencias: en (C) están más circunscritas y redondeadas que en (D).

Matrices tridimensionales

Muchas características morfológicas y funcionales se pierden durante el subcultivo serial por la pérdida de la arquitectura tisular y de las interacciones intercelulares. Debido a esto, se han explorado diversas matrices tridimensionales para el cultivo celular, por ejemplo, las esponjas de celulosa, el Gelfoam[®], los andamios de gelatina y los coágulos de plasma (Figura 7.10)

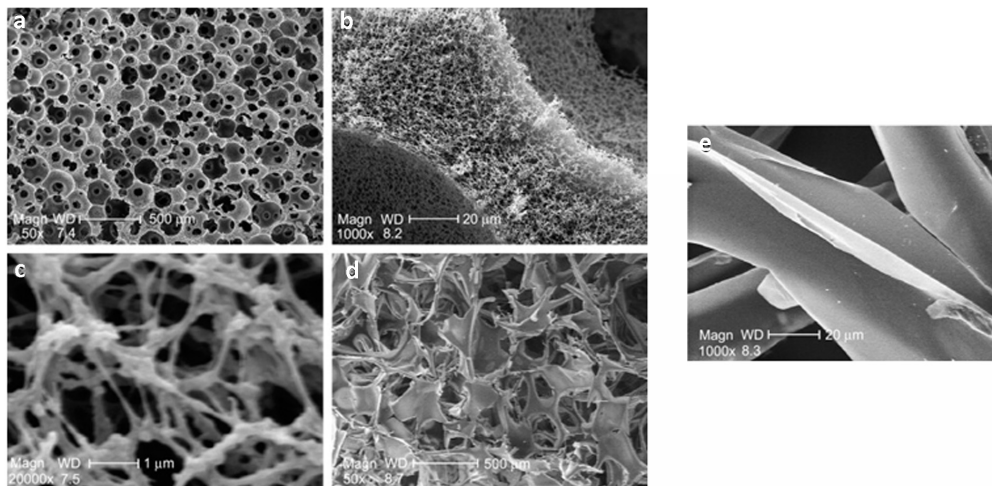


Fig. 7.10 Micrografías a diferente escala de microscopías electrónicas de barrido. (a, b y c) Andamio de gelatina; (d y e) Gelfoam[®]

Estos andamios, además de permitir la adhesión, proliferación y diferenciación, es posible su degradación *in vivo* para ser reemplazado por matriz endógena, por lo que pueden tener aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Existen microtransportadores hechos de poliestireno, sefadex o poliacrilamida, que permiten propagar células dependientes de anclaje en suspensión, sin embargo, aunque técnicamente son tridimensionales, funcionalmente siguen siendo monocapas de 2 dimensiones.

Sustratos no adhesivos

Son utilizados cuando queremos seleccionar a las células independientes de anclaje. El más común es el agar, en el cual sólo las células transformadas pueden formar colonias.

Actividades sugeridas

➤ Realizar una visita al laboratorio de cultivo celular para conocer los diferentes recipientes de cultivo utilizados.

➤ Discutir en clase artículos de divulgación científica sobre las células troncales:

Hochedlinger K. El poder terapéutico de nuestras células. *Investigación y Ciencia* 2010; (406): 24-31.

Liras A. Aplicación de las células madre en la terapéutica ¿Ficción o realidad? 2012;[2 páginas]. Disponible en: http://www.sebbm.es/archivos_tinymce/enero2012-antonioliras-pdffinal.pdf Consultado Junio 14, 2014.

Bibliografía

Freshney RI. *Culture of animal cells, a manual of basic technique*. Wiley; 2005.

8. Medios y suplementos

Objetivos

- Que el alumno analice la importancia del medio para las células en cultivo.
- Que el alumno pueda contrastar las propiedades químicas de los diferentes medios de cultivo utilizados más frecuentemente, para entender su importancia biológica.
- Que el alumno explique la importancia del pH y la temperatura de los medios de cultivo.

Contenido

Desarrollo de los medios de cultivo

Los primeros intentos de cultivar células se realizaron en medios “naturales”, por ejemplo, con líquidos corporales tales como extractos de embrión de pollo, suero, linfa, etc. Conforme fue avanzándose en el cultivo celular, se empezaron a requerir grandes cantidades de medio, cuya calidad fuera más consistente. Esto trajo como consecuencia la aparición del medio basal de Eagle en 1955 y después, del medio esencial mínimo de Eagle (MEM) en 1959, con una constitución química definida, que fue ampliamente adoptada en la mayoría de los laboratorios de cultivo celular. Conforme más líneas celulares empezaron a estar disponibles, fue evidente que algunas de ellas requerían la optimización del medio MEM. Actualmente, para aislar y propagar células de un linaje específico puede requerirse un medio selectivo libre de suero, pero en general, la mayoría de los cultivos celulares se pueden mantener en medio MEM, medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM, 1959) o RPMI (1967), suplementado con suero.

Propiedades fisicoquímicas de los medios de cultivo

La mayoría de las líneas celulares crecen bien a pH de 7.4, pero el pH óptimo para una determinada línea celular puede variar, por ejemplo, las líneas de fibroblastos normales

crecen mejor a intervalos de 7.4 a 7.7, mientras que las células transformadas crecen mejor en intervalos de 7.0 a 7.4. El rojo fenol es un indicador de pH que se utiliza ampliamente en los medios de cultivo comerciales (Figura 8.1): es rosa a pH 7.6, rojo a pH 7.4, naranja a pH 7 y amarillo a pH 6.5.



Fig. 8.1 Rojo fenol como indicador de pH en los medios de cultivo

El CO_2 en la fase gaseosa se disuelve en el medio, estableciéndose un equilibrio con los iones de bicarbonato y estabilizando el pH. Cada medio tiene una concentración de bicarbonato y porcentaje de CO_2 recomendada para alcanzar el pH correcto. Aunque otros *buffers*, como HEPES, pueden controlar el pH dentro del rango fisiológico, la ausencia de CO_2 atmosférico parece limitar el crecimiento celular. La inclusión de piruvato en el medio L15 de Leibovitz permite a las células aumentar su producción endógena de CO_2 , haciéndolas independientes de CO_2 exógeno, así como de bicarbonato (HCO_3^-). Por ello, este medio se recomienda para transportar muestras tisulares.

Es muy importante mantener el pH estable en el medio de cultivo a través de un *buffer*, porque hay condiciones que tienden a disminuirlo, por ejemplo, las líneas celulares transformadas y a alta densidad sobreproducen CO_2 y ácido láctico. A pesar de la pobre capacidad amortiguadora del bicarbonato a pH fisiológico, sigue utilizándose por su baja toxicidad y bajo costo.

El otro constituyente principal de la fase gaseosa es el O_2 . Aunque la mayoría de las células requieren oxígeno para respirar *in vivo*, el metabolismo de la mayoría de las células en cultivo está basado en la glicólisis anaerobia. Las células en cultivo se mantienen con el O_2 atmosférico, el cual se disuelve en el medio. Sin embargo, el cultivo de órganos, particularmente de embriones tardíos, neonatos y adultos, requiere hasta 95% de O_2 en la fase gaseosa. Este aumento en el requerimiento de O_2 puede deberse a un problema de

difusión, relacionado a la geometría y penetración gaseosa en el cultivo de órgano (Figura 8.2), o reflejar la diferencia entre células diferenciadas y células rápidamente proliferantes.

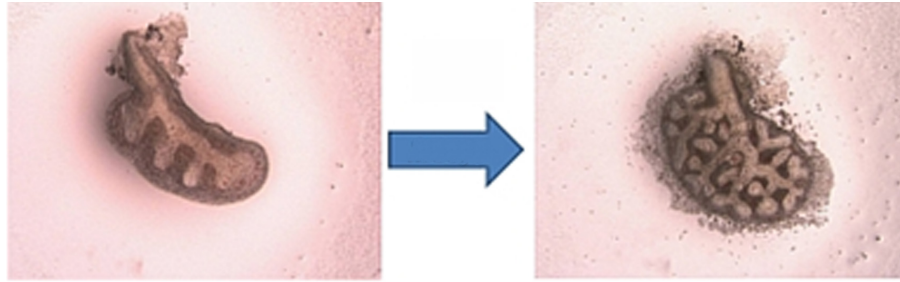


Fig. 8.2 Cultivo de pulmón fetal. Día 0 (izq.) y día 2 (der)

El aumento de O_2 puede ser tóxico para las células en cultivo por la formación de radicales libres, pero el suero en el medio puede disminuir este efecto. Por ello, el control de la tensión de O_2 es más crítico en medio libre de suero.

Debido a que la profundidad del medio de cultivo puede influir en la tasa de difusión del O_2 a las células, es aconsejable mantener la profundidad del medio entre 2 y 5 mm (0.2 a 0.5 mL/cm²).

La mayoría de las células cultivadas tienen una tolerancia bastante amplia a la presión osmótica. Como la del plasma humano es de 290 mOsmol/kg, es razonable asumir que éste es el óptimo para las células humanas *in vitro*, aunque puede ser diferente para otras especies (por ejemplo, alrededor de 310 mOsmol/kg para los ratones). En la práctica, osmolaridades entre 260 mOsmol/kg y 320 mOsmol/kg son bastante aceptables para la mayoría de las células, pero una vez elegido, debe mantenerse con variaciones menores a 10 mOsmol/kg. Los medios ligeramente hipotónicos pueden ser preferibles para cultivos en cajas Petri, para compensar la evaporación del cultivo abierto.

La temperatura óptima para el cultivo celular depende principalmente de la temperatura corporal del organismo del que se obtuvieron las células. Así, la temperatura recomendada para líneas celulares de ave es de 38.5° C y para células de humano es de 37° C. Es importante controlar que la temperatura no sea mayor a la recomendada, porque las células de mamífero no toleran estar 2° C por encima de lo normal más que unas pocas horas (las de humano mueren muy rápidamente a más de 40° C). En cambio, pueden sobrevivir varios días a 4° C e inclusive, pueden congelarse a -196° C bajo condiciones especiales para evitar la formación de cristales, adicionando dimetilsulfóxido (DMSO).

Para obtener resultados reproducibles, debe asegurarse consistencia en la temperatura (dentro de $\pm 0.5^\circ \text{C}$). Las puertas de la incubadora no deben mantenerse abiertas por tiempos más largos que los estrictamente necesarios y la distribución de la temperatura dentro de la incubadora debe ser uniforme, permitiéndose que el aire circule, por lo que no se deben amontonar los recipientes de cultivo.

Vale la pena mencionar que la temperatura también influye sobre el pH del medio de cultivo, porque a bajas temperaturas el CO_2 se disuelve más. Por ello, a temperatura ambiente el pH debe ajustarse a 0.2 unidades por debajo del pH deseado a 37°C .

La viscosidad de un medio de cultivo está influenciada principalmente por el contenido de suero y en la mayoría de los casos tendrá poco efecto sobre el crecimiento celular. Sin embargo, la viscosidad se vuelve importante cuando se agita una suspensión celular (células tripsinizadas o en bioreactores agitados) y en cultivos en medios con poco suero o libres de él. Cualquier daño celular que se produzca en estas condiciones puede reducirse aumentando la viscosidad del medio con carboximetilcelulosa.

Los efectos de la formación de espuma no han sido definidos claramente, pero la desnaturalización de proteínas puede aumentar, así como el riesgo de contaminación si la espuma alcanza el cuello del recipiente de cultivo (Figura 8.3).

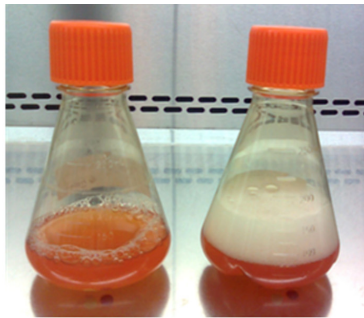


Fig. 8.3 Medios de cultivo con exceso de burbujas

La espuma puede limitar la difusión de gases si introduce líquido en el espacio capilar entre la tapa y el frasco de cultivo, o entre la tapa y la base de una caja Petri.

La formación de espuma es un problema común en cultivos en suspensión y puede causar daño celular (*shear stress*); se pueden agregar sustancias que reduzcan la tensión superficial.

Soluciones salinas balanceadas

Las soluciones salinas balanceadas se componen de sales inorgánicas y puede incluir bicarbonato de sodio y en algunos casos, glucosa. Forman la base de muchos medios completos. Ejemplos de ellas son las sales balanceadas de Earle, las de Hank y el PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). En ocasiones pueden usarse como diluyentes de aminoácidos o vitaminas, para lavados isotónicos, como medios de disección y para incubaciones cortas de no más de 4 h (siempre y cuando tengan glucosa). La elección dependerá de su uso, por ejemplo, las que no tienen calcio suelen utilizarse para disgregar monocapas celulares o tejidos.

Medio completo

El término “medio completo” indica que se le han agregado todo los constituyentes y suplementos necesarios (aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, proteínas, elementos traza, glucosa, etc.). Los aminoácidos que se agregan son los esenciales (que no pueden ser sintetizados por las células) pero en ocasiones también se agregan no esenciales, para compensar cualquier incapacidad particular de un tipo celular para producirlos. Generalmente las vitaminas presentes en el medio son las hidrosolubles, y los demás requerimientos se presume que provienen del suero. Algunos medios especiales también contienen vitaminas liposolubles. Las sales son los principales componentes que contribuyen a la osmolaridad y dependiendo del medio, su concentración puede variar, por ejemplo, para cultivos en suspensión, se reduce el calcio (para disminuir la agregación celular). La glucosa es la principal fuente de energía en la mayoría de los medios, se metaboliza por medio de la glucólisis formando piruvato, que puede ser convertido a lactato o acetoacetato y entrar al ciclo del ácido cítrico y oxidarse, formando CO₂ y agua. La acumulación de ácido láctico en el medio, sobretodo en células transformadas o embrionarias, implica que el ciclo del ácido cítrico no es la ruta prevalente.

En ocasiones, al medio completo se le pueden agregar antibióticos para reducir la frecuencia de contaminación, pero no es aconsejable su uso rutinario porque promueve la aparición de organismos resistentes, enmascara contaminantes crípticos, oculta infecciones de micoplasma y promueve una técnica aséptica pobre. Por eso se recomienda restringir su uso a cultivos primarios o experimentos a gran escala con alto costo de consumibles. Si las

condiciones demandan su uso, quitar tan pronto como sea posible, o si serán usados por largo tiempo, tener un cultivo paralelo libre de antibióticos. En los medios complejos aparecen una variedad de otros compuestos, incluyendo proteínas, factores de crecimiento, péptidos, hormonas, nucleósidos, lípidos y productos intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Estos componentes son muy necesarios en los medios libres de suero o con poca concentración del mismo.

Suero

El suero contiene factores de crecimiento (que promueven la proliferación de células), factores de adhesión y actividad antitripsina (que promueven la adhesión celular al recipiente de cultivo). Es una fuente de minerales, lípidos y hormonas. La mayoría de los sueros usados en los cultivos son de ternera, caballo o bovino adulto. El suero fetal bovino (SFB) es el más utilizado particularmente para líneas celulares más exigentes y para clonación.

Las proteínas son el principal constituyente del suero. Ejemplos de ellas son la albúmina (que transporta minerales, ácidos grasos y hormonas), la fibronectina (que promueve la adhesión celular), la α_2 -macroglobulina (que inhibe a la tripsina) y la transferrina (que transporta hierro, haciéndolo biodisponible y menos tóxico). Las proteínas del suero incrementan la viscosidad del medio, reduciendo el *shear stress* durante el pipeteo y la agitación y pueden agregar capacidad *buffer* al medio.

Otros constituyentes importantes del suero son los factores de crecimiento, como el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), el EGF (factor de crecimiento epidérmico), el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y el IGF-1 (factor de crecimiento parecido a la insulina).

Durante la coagulación (necesaria para obtener el suero a partir de sangre total), se libera PDGF, razón por la cual el suero en cultivo celular tiene mayor poder mitogénico que el suero en el contexto fisiológico del organismo de origen.

En el suero están presentes diferentes hormonas (por ejemplo, en el SFB hay hidrocortisona e insulina), nutrientes, metabolitos (glucosa, aminoácidos, nucleósidos), lípidos (ácido oleico, ácido linolénico, etanolamina, fosfatidiletanolamina), minerales (hierro, cobre, zinc, selenio, usualmente unidos a la albúmina) e inhibidores de proliferación celular (que

pueden ser artefactos de preparación, como toxinas bacterianas o anticuerpos que tengan reacción cruzada con epítomos de superficie celular, o bien fisiológicos, como el TGF- β). La inactivación con calor remueve al complemento del suero y reduce la acción citotóxica de los anticuerpos sin dañar factores de crecimiento, pero podría inactivar constituyentes lábiles.

Selección del medio y suero

Siempre dependerá del tipo celular que se desea cultivar e información al respecto generalmente se puede consultar en la literatura o bien, en los bancos de células de donde se adquirieron. De entre todas las formulaciones comerciales disponibles, el 75% de las ventas lo constituyen el RPMI, DMEM y MEM. El RPMI, aunque originalmente se diseñó para cultivos celulares en suspensión (por ello, no contiene calcio), es muy usado en cultivos en monocapa. El medio Ham's F12, desarrollado para clonar células CHO, es muy utilizado en cultivos primarios.

El suero siempre será una fuente de variabilidad, por ello, cada que se cambie de lote, es necesario verificar la eficiencia de sembrado (sobrevivencia) y el tamaño de colonias (proliferación). Para eso, se requiere sembrar entre 10 a 100 células/ml, en un intervalo de 2 a 20% de suero y vigilarlas por hasta 10 días. Se recomienda realizar una curva de crecimiento para verificar el tiempo de doblaje y la densidad de saturación. Finalmente, es necesario verificar que las características morfológicas de las células en cultivo se conserven y que no haya problemas de esterilidad.

Actividades sugeridas

➤ Buscar la formulación de 2 medios de cultivo de marca comercial conocida y realizar una comparación entre ellas, resaltando las diferencias y las similitudes.

Bibliografía

R. Ian Freshney. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

9. Medio libre de suero

Objetivos

- Que el alumno mencione algunas de las razones por las que se han desarrollado los medios libres de suero.
- El alumno describirá la metodología básica que se emplea en la adaptación celular al medio libre de suero.

Contenido

Aunque muchas líneas celulares se cultivan en medio suplementado con suero, hay 3 razones fundamentales para preferir su cultivo en medios libres de suero: a) necesidad de estandarizar medios entre laboratorios, b) contar con medios especiales para tipos celulares específicos, y c) eliminar la variabilidad inherente al suero. Algunos ejemplos de medios que no requieren de suero son el M199, el CMRL 1066, el F10 de Ham, y el F12. En las apropiadas condiciones hormonales y nutricias, las líneas celulares continuas pueden adaptarse al medio sin suero sin sufrir selección indeseada.

Desventajas del suero

- * Variabilidad fisiológica. Los principales constituyentes del suero, como la albúmina y la transferrina, se conocen, pero el suero contiene una amplia variedad de componentes menores que pueden tener un efecto considerable en el crecimiento celular y cuyas concentraciones se desconocen. Estos componentes incluyen nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, minerales y lípidos.
- * Consistencia y vida útil. El suero varía de lote a lote y un lote dura máximo 1 año (y quizá se deteriore durante ese tiempo).

- * Control de calidad. El cambio de lote implica realizar muchas pruebas para asegurar que el reemplazo sea similar al lote previo (eficiencia de plaqueo, de crecimiento, de funciones especiales, en todas las líneas celulares en cultivo).
- * Especificidad. Cada línea celular puede requerir diferente lote de suero, lo que implicaría almacenar varios simultáneamente.
- * Disponibilidad. Periódicamente, el suministro de suero se restringe por diversas razones (económicas, políticas, o por propagación de enfermedades entre ganado), por lo que un laboratorio de investigación promedio debe reservar de 100 a 200 L de suero/año.
- * Contaminaciones. Es frecuente que el suero se contamine con virus inofensivos para el cultivo celular, pero que representan un factor desconocido adicional para el control del operador. A causa del riesgo de la encefalitis espongiforme bovina, suelen haber restricciones para la compra de suero.
- * Costo. El suero constituye la principal parte del costo de una botella de medio completo (más de 10 veces el costo de los constituyentes químicos). Actualmente, los medios libres de suero son muy caros, pero si aumentara la demanda bajarían los precios.
- * Inhibidores del crecimiento. El suero puede tener actividad inhibidora del crecimiento. En realidad, el efecto neto del suero es una combinación no predecible de factores que estimulan o inhiben el crecimiento (como la hidrocortisona o el TGF- β).
- * Estandarización. Con todas las variables antes mencionadas, es clara la dificultad para estandarizar protocolos experimentales entre diferentes laboratorios.

Ventajas del medio sin suero

Todos los problemas mencionados previamente podrían ser eliminados al utilizar medios sin suero, pero además, hay otros 2 beneficios:

- * Selectivo para un tipo celular. Puede separar linajes e incluso estadios de desarrollo en células hematopoyéticas, a través del uso correcto de factores de crecimiento particulares.
- * Regulación de proliferación y diferenciación. Permiten cambiar fácilmente de un estado de proliferación a uno de diferenciación, alterando la concentración de un factor de crecimiento u otros inductores.

Desventajas del medio sin suero

- * Multiplicidad. Puede ocurrir que cada tipo celular requiera una receta diferente de medio libre de suero, incluso aún entre líneas celulares de tumores del mismo origen. Aunque este grado de especificidad puede constituir una ventaja para aislar un tipo celular específico, es un problema para laboratorios que trabajan simultáneamente diferentes líneas celulares.
- * Selectividad. La transición de los cultivos celulares a medios libres de suero, aunque deseable, no es tan sencilla. Puede implicar la selección de un linaje celular que no sea la típica de la población total.
- * Pureza de los reactivos. La remoción de suero requiere que el grado de pureza de los reactivos y del agua sea extremadamente alta (el suero tiene acción detoxificante)
- * Menor proliferación celular. En general, el uso de los medios libres en suero enlentece los cultivos, e incluso, se logran menos generaciones con las líneas celulares finitas.
- * Disponibilidad. Los medios libres de suero de adecuado control de calidad suelen ser escasos y los reactivos para su preparación, más caros.

Subcultivo libre de suero

No debemos olvidar que el suero contiene factores de adhesión como la fibronectina, por lo que al retirarlo del medio, puede ser necesario tratar la superficie de plástico del recipiente de cultivo con fibronectina, laminina o poli-D-lisina, para que las células se adhieran adecuadamente. Al subcultivar, requeriremos además algunos inhibidores de proteasas, pues para despegar las células del sustrato, se utiliza la enzima tripsina que luego es inactivada por el suero. Al estar éste ausente, se requiere adicionar aprotinina o inhibidor de tripsina de la soya. Como la tripsina “cruda” es una mezcla de proteasas, podría ser necesario inhibidores diferentes o lavar las células por centrifugación.

Las hormonas que se usan cuando se elimina el suero del medio son la somatotropina, la insulina y la hidrocortisona, pero dependiendo del tipo celular, puede requerir T₃, estrógenos, andrógenos, progesterona, prolactina, o FSH. Los factores de crecimiento pueden actuar sinérgica o aditivamente con hormonas y nutrientes.

Selección del medio libre de suero

Si la razón para usar medio sin suero es porque deseamos promover el crecimiento selectivo de un tipo de células particulares, entonces es conveniente guiarnos de la información disponible en la literatura. Por otro lado, si la razón es simplemente evitar su uso en líneas celulares continuas o hibridomas para reducir la probabilidad de proteínas de suero o virales en el producto celular, entonces la gama de posibilidades es mayor, pues hay una gran cantidad de medios disponibles comercialmente, por ejemplo, el medio Opti-MEM es muy utilizado para células hematopoyéticas.

Muchas formulaciones fueron diseñadas inicialmente para cultivo de hibridomas. Se debe considerar que las formulaciones comerciales suelen ser secretos.

Sustitutos de suero

Aunque no sustituyen a los medios libres de suero, existen productos comerciales que se han desarrollado para reemplazar todo o parte del suero en los medios convencionales, por ejemplo, Excyte, Ventrex, Un-serum, etc. Proporcionan mayor consistencia, pero puede haber variación entre lotes. Su principal objetivo es abaratar los costos, pues disminuye la cantidad de suero necesaria (Figura 9.1).

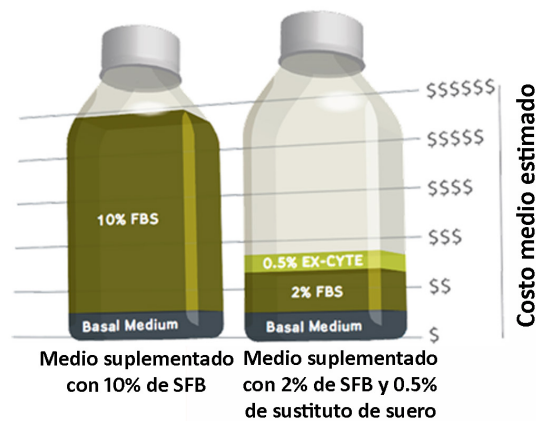


Fig. 9.1 Comparación de los costos cuando se usan sustitutos de suero

Adaptación al medio libre de suero

Muchas líneas celulares continuas se pueden adaptar al crecimiento en ausencia de suero, pero a menudo implica un período prolongado de selección de un componente minoritario de la población celular, por lo que es importante asegurarse de que las propiedades de la

línea celular no se pierdan durante este periodo de selección. La adaptación se lleva a cabo a lo largo de varios subcultivos en serie, disminuyendo la concentración de suero gradualmente. Una vez que la proliferación celular se estabiliza a una concentración de suero inferior, las células se subcultivan en una concentración más baja, hasta que la proliferación celular se restablece, para nuevamente disminuir el suero en una nueva ronda de subcultivo. Durante el proceso de adaptación puede ser necesario suplementar el medio con factores conocidos para reemplazar el suero.

Actividades sugeridas

➤ Buscar la formulación de 2 medios de cultivo libres de suero de marca comercial conocida y realizar una comparación entre ellas, resaltando las diferencias y las similitudes. Contrastar con las formulaciones de medios de cultivo convencionales.

➤ Discutir en clase artículos de divulgación científica sobre células de linaje específico obtenidas gracias a su cultivo en medios libres de suero:

Gimpel J. Skin layer grown in lab could replace animal testing. 2014;[2 páginas]. Disponible en: <http://www.kcl.ac.uk/newsevents/news/newsrecords/2014/April/Skin-layer-grown-from-human-stem-cells-could-replace-animals-in-drug-and-cosmetics-testing.aspx> Consultado Junio 14, 2014.

Paddock C. Mature, functioning liver cells made from skin cells. 2014;[2 páginas]. Disponible en: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/273090.php> Consultado Junio 14, 2014.

Bibliografía

R. Ian Freshney. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

10. Cultivos primarios

Objetivos

- El alumno reconocerá los aspectos principales de la obtención de un cultivo primario.
- El alumno ejemplificará los efectos debidos a errores en la metodología de la obtención de cultivos primarios.

Contenido

Introducción

Se le llama cultivo primario a la etapa comprendida entre el aislamiento celular y el primer subcultivo. Hay cuatro fases a considerar en cada cultivo primario: (1) obtención de la muestra (Figura 10.1), (2) disección del tejido (Figura 10.2), (3) disgregación (Figura 10.3),



Fig. 10.1 Obtención de embriones de pollo (día embrionario 7)

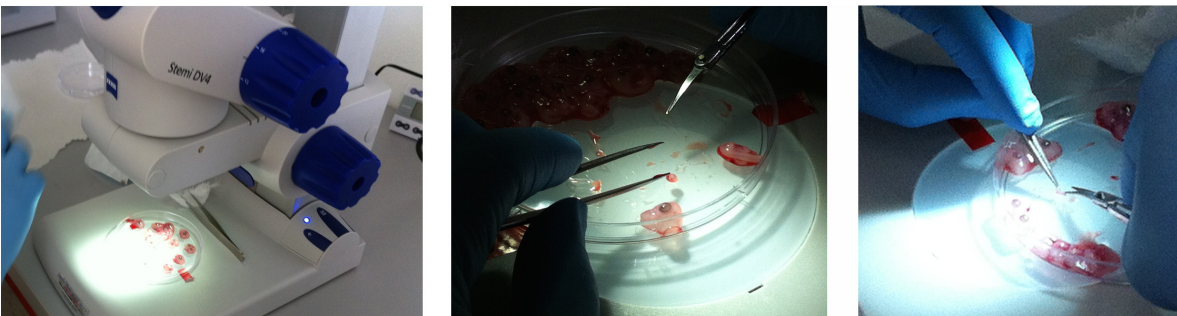


Fig. 10.2 Disección de corazones de embriones de pollo (día embrionario 7)



Fig. 10.3 Disgregación enzimática a 37°C y agitación, para obtener cardiomiocitos embrionarios de pollo

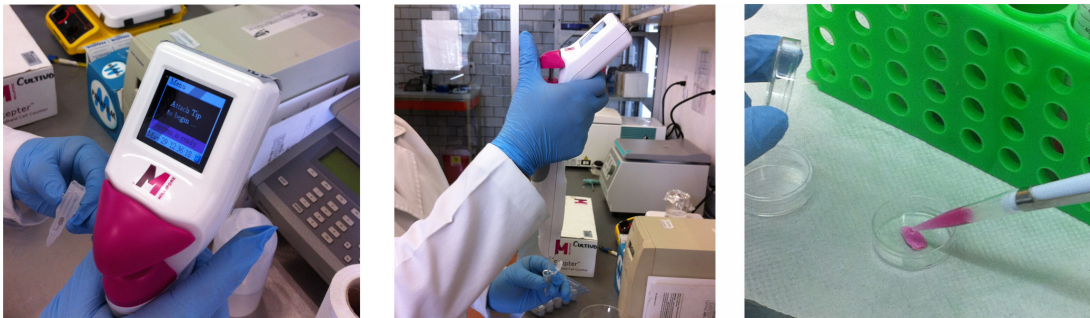


Fig. 10.4 Conteo celular y sembrado de los cardiomiocitos embrionarios de pollo

y (4) sembrado en un recipiente de cultivo (Figura 10.4).

Después de obtener la muestra, un cultivo primario puede lograrse permitiendo que las células migren a partir de un fragmento de tejido adherido a un sustrato adecuado o mediante la disgregación del tejido mecánica o enzimáticamente, para producir una suspensión celular, algunas de las cuales se adherirán al sustrato. Las enzimas que se utilizan con mayor frecuencia para la disgregación del tejido son preparaciones crudas de tripsina, colagenasa, elastasa, pronasa, dispasa, DNasa y hialuronidasa, solas o en combinaciones. Las preparaciones crudas de las enzimas (con otras proteasas contaminantes) son mejores disgregando el tejido que las enzimas purificadas (generalmente menos tóxicas y más específicas en su acción).

Aunque cada tejido puede requerir un conjunto diferente de condiciones, ciertos requisitos son compartidos por la mayoría de ellos:

- a) Remover tejido necrótico y grasa.
- b) Cortar finamente con instrumentos especiales (causando el daño mínimo).
- c) Después de su uso, las proteasas deben eliminarse con centrifugación gentil.

- d) La concentración celular debe ser mucho mayor que la normalmente usada para subcultivo (porque muchas de ellas no sobrevivirán el proceso).
- e) Es preferible utilizar un medio rico, como el F12, a un medio simple, como el MEM. Si se requiere suero, es mejor usar el SFB.
- f) Los tejidos embrionarios son más fáciles de disgregar y proliferan más rápidamente que los adultos.

Aislamiento del tejido

Antes de trabajar con tejido humano o animal, debemos cumplir con todas las normas de ética médica o de legislación vigente sobre la experimentación con animales. Se debe esterilizar el sitio de resección, retirar el tejido asépticamente y transferirlo al laboratorio de cultivo en medio de transporte tan pronto como sea posible. No se pueden diseccionar animales en el laboratorio de cultivo, por el riesgo de contaminaciones microbianas. Si es inevitable un retraso en la transferencia del tejido, éste puede mantenerse a 4° C durante un máximo de 72 h. Los embriones de ratón son una fuente conveniente de células para cultivo de fibroblastos no diferenciados (frecuentemente usados como *feeder layer*); por otro lado, los embriones de pollo son más fáciles de disectar, por ser más grandes que los de ratón en el estadio de desarrollo equivalente.

Explante primario

La técnica del explante fue el método original para iniciar el cultivo de tejido. Consiste en tomar un pequeño fragmento de tejido y embeberlo en plasma coagulado mezclado con extracto embrionario, para mantenerlo fijo y visualizarlo con un microscopio convencional (Figura 10.5).

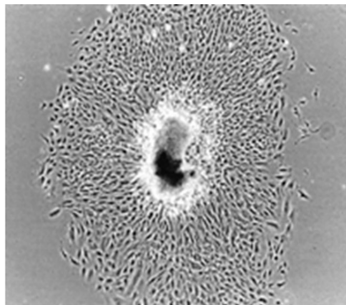


Fig. 10.5 Micrografía de contraste de fases que muestra el crecimiento epitelial a partir de un explante primario de mucosa después de 10 días en cultivo (67x)

El plasma coagulado, junto con el extracto embrionario, proporcionan nutrientes y factores de crecimiento que estimulan la migración celular desde el explante. Sus principales desventajas son la pobre adhesividad de algunos tejidos y la selección celular.

Disgregación tisular

La adhesión célula-célula en los tejidos está mediada por una variedad de moléculas de adhesión, algunas de las cuales son dependientes de calcio (cadherinas) y por lo tanto son sensibles a los agentes quelantes como EDTA o EGTA. Las integrinas, que se unen a la matriz extracelular, también tienen dominios de unión dependientes de Ca^{2+} .

El procedimiento más sencillo de disgregación tisular es por métodos enzimáticos, partiendo de una solución de disgregación simple a una solución más compleja, con tripsina o tripsina/EDTA como punto de partida, y la adición de otras proteasas para mejorar la disgregación. En general, el incremento en la pureza de la enzima disminuye toxicidad, pero también disminuye la disgregación. Este método de obtención de cultivo primario selecciona en base a la capacidad celular de soportar el tratamiento con proteasas. Entre mayor sea el estrés requerido, los componentes más frágiles del tejido se destruirán. La técnica a seguir consiste en incubar el tejido con tripsina a 37° C por hasta 30 min, o bien, pre-incubar a 4° C por 6-18 h (para permitir su difusión en el tejido) y luego a 37° C por 20 min.

En muchas ocasiones, la disgregación enzimática requiere combinarse con métodos mecánicos, como se aprecia en la figura 10.3, en donde además de la incubación del tejido con la solución enzimática, se agita con ayuda de una pipeta y luego con un agitador magnético en una parrilla de agitación.

Sembrado

Una vez que se obtiene una suspensión celular homogénea, se determina la concentración celular y se siembran sobre recipientes adecuados para incubar en las condiciones necesarias. Durante esta fase, el crecimiento celular y la aparición de contaminaciones debe vigilarse estrechamente. Puede ser necesario realizar cambios de medio de cultivo. Una vez que el cultivo primario ha ocupado todo el sustrato disponible, es necesario subcultivar.

Actividades sugeridas

➤ Realizar la disección de tejido cardiaco con microscopios estereoscópicos del laboratorio de docencia, a partir de embriones de pollo E7.

➤ Observar videos sobre obtención de cultivos primarios:

<http://www.youtube.com/watch?v=eHDapIC6QvY>

<http://www.youtube.com/watch?v=iJrvPkpp4QA>

Bibliografía

R. Ian Freshney. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

11. Subcultivo y líneas celulares

Objetivos:

- El alumno explicará cómo se realiza un subcultivo y en qué momento se debe realizar.
- El alumno reafirmará temas previamente revisados.

Contenido:

Propagación

El primer subcultivo representa una transición importante. La necesidad de subcultivar significa que el cultivo primario ha ocupado todo el sustrato disponible. La proliferación celular ha llegado a ser una característica importante y después de este primer pase, la fracción celular en crecimiento es alta, hasta del 80%. De un cultivo primario muy heterogéneo, emerge una línea celular más homogénea, cuya importancia práctica es que ahora se puede propagar, caracterizar y almacenar. El mayor número de células permite un amplio rango de posibilidades experimentales.

Terminología

Una vez que el cultivo primario es subcultivado (coloquialmente se dice que se ha realizado un “pase”), se le conoce como línea celular. Este término implica la presencia de varios linajes celulares de fenotipos distintos o similares. Si una línea celular es seleccionada (por clonación, separación física u otra técnica) por tener cierta propiedad específica, esta línea celular se convierte entonces en una cepa celular. Si una línea celular se transforma *in vitro*, da lugar a una línea celular continua y si ésta es clonada y caracterizada, entonces es conocida como cepa celular continua. Es vital confirmar la identidad de la línea celular para

excluir la posibilidad de contaminación cruzada. Las propiedades de las líneas celulares continuas y finitas se muestran en la Tabla 11.1.

El primer subcultivo da lugar al cultivo secundario, y el segundo subcultivo al cultivo terciario, y así sucesivamente. En la práctica esta nomenclatura es rara vez utilizada más allá del cultivo terciario. Lo que es importante considerar es el número de pases que se han dado a las células (o veces que se ha subcultivado), parámetro diferente al número de generación, que se refiere al número de doblajes que la población celular ha llevado a cabo. Si cada subcultivo se divide a la mitad, la relación de división (o *split ratio*) es 1:2, y el número de pases es el mismo que el número de generaciones. Pero si el subcultivo es llevado a cabo en relaciones mayores a 1:2, el número de generación (indicador significativo de la edad del cultivo) incrementará más rápido que el número de pase.

Propiedades	Finita	Continua
Ploidía	Euploide, diploide	Aneuploide
Transformación	Normal	Inmortal, tumorigénico
Dependencia de anclaje	Si	No
Inhibición por contacto	Si	No
Limitación por densidad	Si	Reducida o perdida
Modo de crecimiento	Monocapa	Monocapa o suspensión
Mantenimiento	Cíclico	Posible estado estacionario
Requerimiento de suero	Alta	Baja
Eficiencia de clonación	Baja	Alta
Marcadores	Específico de tejido	Antigénico, enzimático, cromosómico
Funciones especiales	Frecuentemente perdidas	Pueden ser conservadas
Tasa de crecimiento	Lenta (24-96 h)	Rápida (12-24 h)
Rendimiento celular	Bajo	Alto
Parámetros de control	No. de generación, marcadores específicos de tejido	Características de cepa

Tabla 11.1 Propiedades de las líneas celulares continuas y finitas

Edad del cultivo

Las líneas celulares con número limitado de generaciones se conocen como finitas y su comportamiento es muy reproducible. Usualmente llevan a cabo entre 20 y 80 doblajes de población antes de la extinción. El número depende de la especie, del linaje, de las condiciones del cultivo y de la variación clonal, pero es consistente para una línea celular bajo las mismas condiciones.

Por ello, es importante la referencia al número de doblaje aproximado desde el explante. En cambio, las líneas celulares continuas perdieron el control de la senescencia, por lo que el número de generación es menos importante que el número de pases desde el último descongelamiento.

Designación

A las líneas celulares nuevas se les debe de asignar un código, por ejemplo NHB (para *Normal Human Brain*); un número, si varias líneas celulares se obtuvieron de la misma fuente (NHB1, NHB2, etc.), y si fue clonada, el número de clona (NHB1-1, NHB1-2, etc.). En general, las iniciales del donante no se usan por razones de confidencialidad. Es importante llevar una bitácora de biopsias o especímenes antes de iniciar un cultivo y asegurarse que el nombre de la línea celular sea único.

Selección

Aparte de los requerimientos funcionales específicos, hay una serie de cuestiones que deben responderse antes de elegir una línea celular para trabajar, por ejemplo, ¿hay una línea celular continua que exprese la función que necesitamos de manera correcta?, porque en general, son más fáciles de mantener, crecen más rápido, se clonan más fácil, se adaptan más rápido al medio libre de suero y tienen mayor rendimiento por frasco. Si no es importante la especie, es preferible escoger no humanas, porque requieren menos permisos y podría ser más accesible la obtención de tejido original. Si se escoge una línea finita, ¿hay suficientes *stocks* disponibles?, ¿o generarás tu propia línea celular? Si escoges líneas continuas, ¿están disponibles *stocks* auténticos?, ¿qué tan bien caracterizada está la línea?, ¿realizarás la caracterización necesaria?, ¿expresa las características correctas?; si estas usando una transfectante, ¿tienes el equivalente normal disponible?, ¿será requerido?, ¿qué

tan estable es?, ¿ha sido clonada?, ¿cuánto requieres en términos de tasa de crecimiento, facilidad de cosecha, etc.?, ¿cuáles son sus características de crecimiento (tiempo de doblaje, densidad de saturación, eficiencia de plaqueo, habilidad para crecer en suspensión)?

Rutina de mantenimiento

Un cultivo celular necesita un cambio de medio periódico, seguido de un eventual subcultivo, si las células lo requieren. Aún en los cultivos no proliferativos se requiere el cambio periódico de medio, porque las células lo metabolizan. Dependiendo de la línea celular, puede requerirse un cambio de medio semanal, o bien, un subcultivo por semana.

Morfología celular

Es vital examinar el cultivo cuidadosamente, para confirmar ausencia de contaminación y buscar signos de deterioro, como granularidad perinuclear, vacuolación citoplasmática y redondeamiento con despegamiento del sustrato (Figura 11.1). Tales signos pueden implicar que el cultivo requiere un cambio de medio, o podrían indicar un problema más serio, como medio o suero tóxico o inadecuado, contaminación microbiana o senescencia.

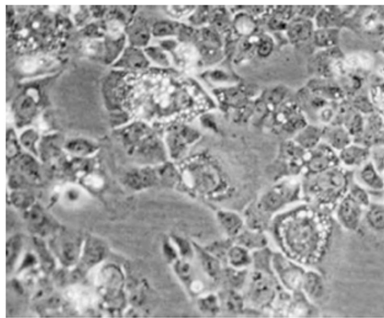


Fig. 11.1 Vacuolación y granulación en células epiteliales bronquiales por medio inadecuado

Las deficiencias en el medio pueden iniciar apoptosis. Todos estos cambios se deben prevenir, pues es difícil revertir el deterioro. Para lograr la familiaridad a la línea celular, puede ser recomendable realizar fotografías a densidades celulares específicas.

Reemplazo del medio

Son 4 los factores que indican la necesidad de reemplazar el medio: el pH, la concentración celular, el tipo celular y el deterioro morfológico. La mayoría de las células detienen su crecimiento cuando el pH cambia de 7 a 6.5 y pierden viabilidad entre 6.5 y 6. También es importante la tasa del descenso (si cae 0.1 unidad/día, no hay prisa para cambiar el medio, pero si cae 0.4 unidades/día, si es necesario). Las células normales paran de dividirse a alta densidad, se bloquean en fase G1 y se deterioran poco, pero las células transformadas y algunas embrionarias, se deterioran rápidamente a altas densidades, a menos que el medio sea cambiado diariamente o se subcultiven. El deterioro morfológico debe ser anticipado a través del examen visual regular y la familiaridad con la línea celular.

El volumen de medio en un recipiente de cultivo debe de ser de 0.2 a 0.5 mL/cm² (el límite superior depende de la difusión gaseosa, así que en células con alto requerimiento de O₂, se recomienda 2 mm de profundidad, mientras que en células con bajo requerimiento, la profundidad puede ser de 5 mm).

Medio de mantenimiento

El medio de mantenimiento se utiliza en líneas celulares finitas cuando la estimulación de la mitosis no es deseable. Se trata de medio de cultivo convencional con menos del 2% de suero, o bien, medios libres de suero con omisión de factores de crecimiento y otros mitógenos. Las células transformadas no son aptas para este procedimiento, porque pueden continuar dividiéndose exitosamente o bien, se pueden deteriorar. El medio de mantenimiento puede promover la expresión de un fenotipo diferenciado.

Subcultivo

Cuando un cultivo celular está a baja densidad y creciendo lentamente, puede ser preferible remover solamente la mitad de su medio de cultivo y reemplazarlo por medio fresco. Cuando una línea celular es subcultivada, el crecimiento de las células hasta el momento del siguiente subcultivo usualmente sigue un patrón estándar (Figura 11.2). Un período de latencia (fase *lag*) después del sembrado es seguido por un período de crecimiento exponencial (fase *log*). Cuando la densidad celular (células/cm²) alcanza un nivel en que toda la superficie disponible está ocupada o cuando la concentración celular (células/ml)

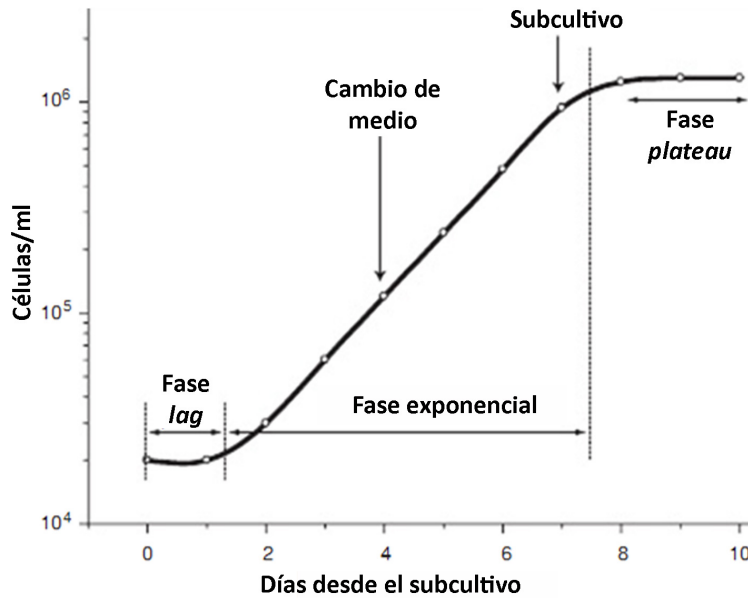


Fig. 11.2 Curva de crecimiento

excede la capacidad del medio, el crecimiento cesa o se reduce. Entonces el medio debe ser cambiado o el cultivo debe dividirse. Para una línea celular adherente, el subcultivo implica la remoción del medio y disociación de las células en la monocapa con tripsina (o alguna otra proteasa). Es conveniente hacer pruebas y seleccionar el protocolo menos severo compatible con alta viabilidad y buena suspensión celular.

La necesidad para subcultivar una monocapa está determinada por los siguientes criterios:

- a) Densidad del cultivo: las células no transformadas deben subcultivarse tan pronto como alcancen la confluencia. Si se dejan así por 24 h, se retiran del ciclo celular y tomará más tiempo recuperarlas cuando sean subcultivadas. Las células transformadas deben subcultivarse en cuanto alcancen la confluencia, porque aunque continúan proliferando más allá de la confluencia, se deteriorarán después de 2 doblajes y la eficiencia del resembrado declinará.
- b) Agotamiento del medio. El cambio de pH indica la necesidad de cambio de medio, pero si la caída de pH es muy rápida, puede requerirse subcultivar. La caída de pH también puede sugerir contaminación microbiana.
- c) Tiempo desde el último subcultivo. Es recomendable establecer subcultivos rutinarios bajo un estricto programa, para que el comportamiento celular sea reproducible. Una vez que la rutina se establece, las desviaciones de ella indicarían deterioro de las células.

d) Requerimientos experimentales. Cuando las células se requieren para propósitos diferentes a la propagación rutinaria, deben ser subcultivadas para incrementar el *stock* o para cambiar el tipo de recipiente de cultivo o el medio. Nunca debe hacerse en el periodo de latencia, lo más recomendable es que se realice entre la segunda mitad de la fase *log* y antes de entrar a la fase *plateau*. Cuando se subcultivan diferentes líneas celulares a la vez, éstas deben manejarse separadamente, por el riesgo de la contaminación cruzada.

Ciclo de crecimiento

Los pases rutinarios llevan a la repetición de un ciclo de crecimiento estándar (Figura 11.3). Si las células están creciendo correctamente, deben alcanzar la misma concentración celular después del mismo tiempo en cada ciclo dado, si la concentración de sembrado y el intervalo de subcultivo permanecen constantes.

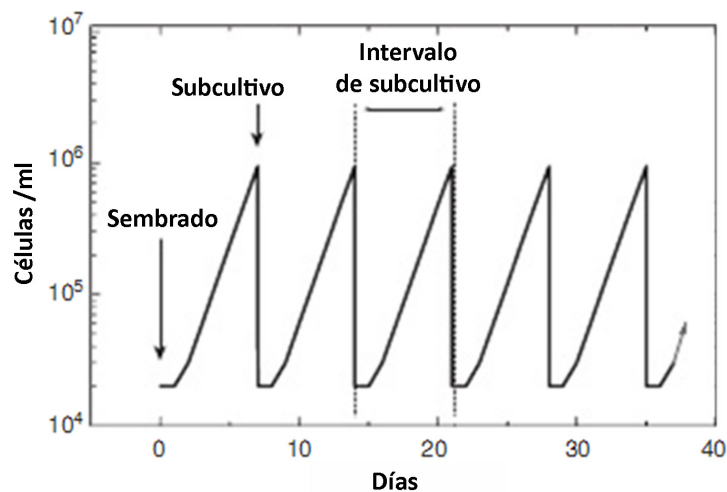


Fig. 11.3 Repetición de ciclos de crecimiento estándar durante subcultivos rutinarios de una línea celular

Es altamente recomendable familiarizarnos con el ciclo de crecimiento de cada línea celular, pues éste controla la concentración de sembrado, la duración de crecimiento antes del subcultivo, la duración de los experimentos y los tiempos apropiados para el muestreo, permitiendo mayor consistencia, porque las células en diferentes fases del ciclo de crecimiento se comportan diferente con respecto a proliferación celular, actividad enzimática, glucólisis, respiración, síntesis de productos especializados, etc.

La concentración celular que debemos utilizar para subcultivar debe ser la mínima que permita entrar rápidamente a la fase de crecimiento logarítmico pero que alcanzará la fase de *plateau* justo en el momento que sea conveniente para el siguiente subcultivo.

Propagación en suspensión

Los cultivos en suspensión tienen la ventaja de no requerir proteasas para realizar subcultivos, lo que significa que el proceso es menos traumático. Además, no requieren reemplazo total del medio de cultivo, basta realizar diluciones.

Como se mencionó en secciones previas, el vidrio o plástico no requiere de un tratamiento especial para cultivo de células en suspensión y si la profundidad del cultivo es ≥ 5 mm, se requiere agitación. Cuando se realiza el subcultivo en suspensión, se puede mantener en el mismo frasco, pero aumenta la probabilidad de contaminación.

Estandarización de las condiciones de cultivo

Esencial para mantener la estabilidad fenotípica. Por ello, se recomienda no variar el medio de cultivo, usar el mismo lote de suero, utilizar la misma marca de recipientes para cultivo y contar siempre con reemplazos de las líneas celulares en *stocks* congelados.

Uso de antibióticos

El uso continuo de antibióticos favorece las contaminaciones crípticas, particularmente micoplasma y el desarrollo de organismos resistentes a antibióticos. Además, puede interferir con procesos celulares bajo investigación. Sin embargo, puede haber circunstancias especiales en las que se tenga que usar antibióticos; si este es el caso, la recomendación es que no sea permanente y que se tengan *stocks* libres de antibióticos.

Actividades sugeridas

- Visita al laboratorio de cultivo para observar el subcultivo de una línea celular
- Observar videos sobre el procedimiento del subcultivo (Video 3: *Passaging Cells*):
<http://es-mx.invitrogen.com/site/mx/es/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>
<http://www.youtube.com/watch?v=PC51Z5FKZXQ>

Bibliografía

R. Ian Freshney. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

12. Clonación y selección

Objetivo

- El alumno expondrá claramente el significado de la clonación y su relación con la selección celular.

Contenido

Clonación celular

Un problema recurrente en el cultivo celular es la preservación de un tipo celular específico y sus propiedades especializadas. Aunque el microambiente juega un papel importante en el mantenimiento de estas propiedades especializadas en cultivo, el crecimiento excesivo de células no especializadas y de células de linaje incorrecto sigue siendo un problema importante. El problema de la heterogeneidad de un cultivo se puede afrontar aislando una cepa celular pura por medio de clonación.

Aunque la técnica es relativamente fácil en líneas celulares continuas, su éxito en la mayoría de los cultivos primarios es limitado, por su pobre eficiencia. Un problema mayor en los cultivos celulares finitos, es que éstos tienen un número limitado de generaciones, por lo que cuando una clona ha producido suficientes células, éstas estarán muy cercanas a la senescencia.

La clonación es utilizada para disminuir la heterogeneidad de un cultivo, en ensayos de sobrevivencia, para optimizar condiciones de crecimiento y para determinar quimiosensibilidad y radiosensibilidad. Las células adherentes pueden ser clonadas sobre cajas Petri, multipozos, o frascos, y es relativamente sencillo discernir entre colonias individuales. La micromanipulación es el único método que asegura la clonalidad (que una colonia deriva de una sola célula). La clonación también puede realizarse en cultivos en suspensión, sembrando sobre gel (agar) o sobre una solución viscosa (Methocel™).

La clonación por dilución es la técnica más ampliamente utilizada, basada en la observación de que las células diluidas por debajo de cierta densidad, forman colonias discretas. Se recomienda utilizar placas de microtitulación para sembrar las células a baja densidad.

Como la densidad durante la clonación es baja, es razonable dejar el cultivo por hasta 2 semanas sin realizar cambio de medio.

Cuando las células son sembradas a baja densidad, la tasa de sobrevivencia disminuye. En cultivos primarios y líneas celulares finitas, la eficiencia de sembrado puede ser tan pequeña como de 0.5 a 5%. Afortunadamente, conforme han mejorado los medios de cultivo, la eficiencia de sembrado ha ido incrementándose. Otra opción, es el uso de *feeder layer* o medios condicionados.

Para mejorar el crecimiento clonal, es recomendable utilizar un medio de cultivo rico en nutrientes, optimizado para la línea celular que estamos clonando; si vamos a utilizar suero, es preferible escoger el SFB; también se pueden agregar hormonas específicas, como insulina. Durante la clonación, cobra mayor relevancia el ajuste preciso del CO₂ y puede ser necesario utilizar sustratos (como fibronectina), medios condicionados o *feeder layers* (con arresto en el ciclo celular).

Aislamiento de las clonas

Cuando clonamos, lo que se busca es realizar una selección específica de células. Si el procedimiento se realiza directamente en placas multipozos con células que crecen en monocapa, el aislamiento de las clonas es sencillo, pues una clona se encontrará en un pocillo (aún así, es necesario confirmar el origen clonal por medio de visualización rutinaria con un microscopio). En cambio, si las células fueron clonadas en cajas Petri, no hay separación física de clonas, pero se pueden usar anillos de clonación (Figura 12.1). La clonación celular puede tener como finalidad el aislar células que son resistentes a una determinada molécula.

Las células pueden hacerse resistentes a una gran variedad de moléculas, como antibióticos, antimetabolitos, metales tóxicos, etc., poniéndolas bajo tratamientos específicos que promuevan la aparición de dicha resistencia.

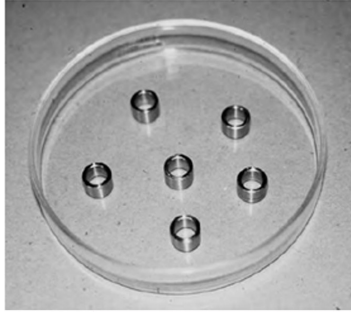


Fig. 12.1 Anillos de clonación sobre caja Petri. Su diámetro interno debe encerrar completamente una sola clona.

La interacción de un tipo celular con determinadas moléculas de adhesión también puede ser un parámetro para seleccionarla. Por ejemplo, una suspensión de células primarias puede sembrarse en un frasco y después de 30 min ser transferido a un segundo frasco y así sucesivamente; este procedimiento seleccionará a las células con mayor capacidad de adhesividad en el primer frasco y con la menor capacidad de adhesión en el último.

Actividades sugeridas

➤ Organizar en el salón de clase la lectura del tema por equipos, para presentar un resumen en plenaria.

Bibliografía

R. Ian Freshney. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

13. Caracterización

Objetivo

- El alumno reconocerá la importancia de caracterizar un cultivo celular

Contenido

Hay 6 principales razones para caracterizar una línea celular: demostrar la ausencia de contaminación cruzada, confirmación de la especie, correlación con el tejido de origen, determinar si la línea celular es transformada o no, buscar inestabilidad genética y variación en el fenotipo y demostración de características únicas. Se debe registrar la información de la línea celular desde el momento en que se aisló el tejido o desde el momento en que se recibió, detallando su origen, sus características y el manejo requerido.

Autenticación

Requiere que la línea celular sea caracterizada al recibirse y luego periódicamente durante su uso (esos datos deben agregarse a su procedencia). La caracterización (Tabla 13.1) es vital para determinar la funcionalidad y autenticidad (descartando contaminación cruzada).

Criterio	Método
Cariotipo	Bandeo cromosómico
Análisis de isoenzimas	Electroforesis de geles de agarosa
Antígenos de superficie	Inmunohistoquímica
Citoesqueleto	Inmunocitoquímica para citoqueratinas específicas
<i>DNA fingerprinting</i>	Patrón de restricción en microsatélites (VNTR)
<i>DNA profile</i>	PCR de minisatélites (STR)

Tabla 13.1 Algunas técnicas de caracterización. STR, *short tandem repeats*; VNTR, *variable number of tandem repeats*.

Morfología celular

Observar la morfología celular, es la forma más simple y directa de identificar células. Sus inconvenientes son la plasticidad de la morfología en respuesta a las condiciones de cultivo y que las alteraciones en el sustrato y constitución del medio alteran la morfología celular. Las observaciones con el fin de comparar morfológicamente siempre deben realizarse bajo las mismas condiciones. Al usar el microscopio invertido, la magnificación máxima del objetivo debe ser limitada a 40x. Para el microscopio de contraste de fases, el objetivo de 10x da el suficiente detalle para un examen rutinario. Es importante revisar la fase de crecimiento, el estado de las células y el medio de cultivo. Es útil tener un registro fotográfico en diferentes densidades celulares para cada línea celular, que se pueden complementar con fotografías de preparaciones teñidas (Figura 13.1).

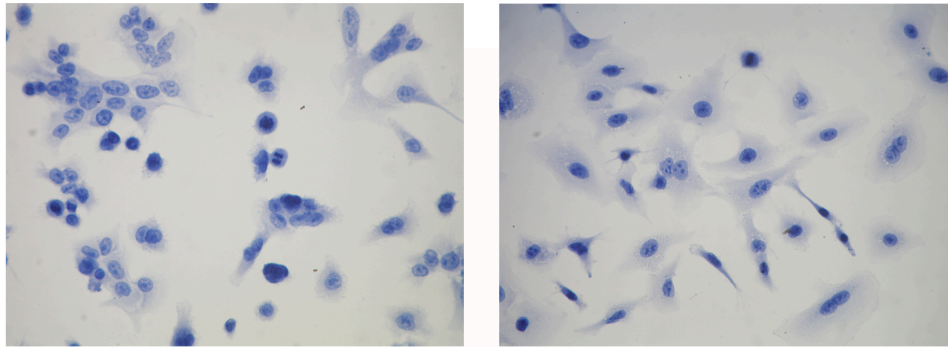


Fig. 13.1 Líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar teñidas con hematoxilina. Se aprecian diferencias en su morfología. A549 a la derecha y H1944 a la izquierda (40x)

Los términos “fibroblastoide” y “epiteloide” se utilizan con poco rigor en cultivo celular y a menudo describen la apariencia más que el origen de las células (Figura 13.2).

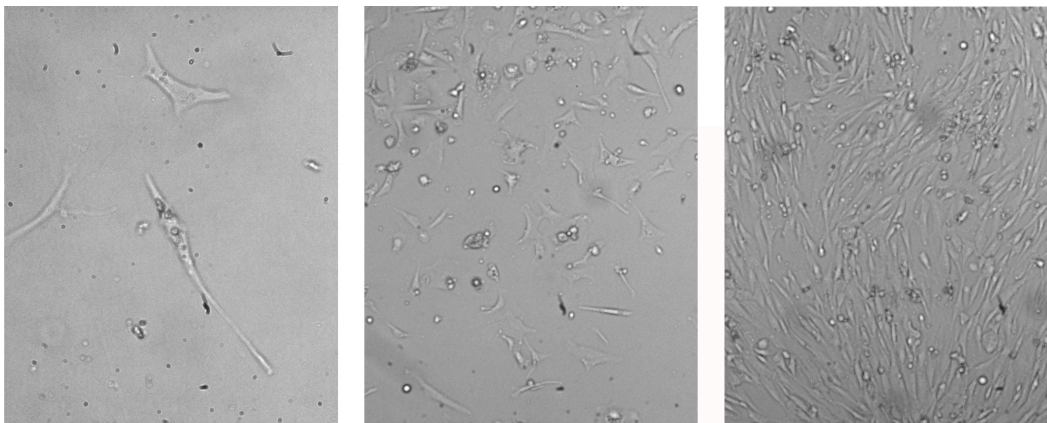


Fig. 13.2 Morfología fibroblastoide en un cultivo primario de tejido cardíaco de embrión de pollo, a diferentes densidades

Por lo tanto, una célula migratoria bipolar o multipolar, con una longitud por lo general 2 veces mayor que su anchura, es llamada fibroblastoide, mientras que una célula poligonal, con dimensiones más regulares y que crece en parches junto con otras células es generalmente considerada epiteloide.

Análisis de cromosomas

El cariotipo es uno de los mejores criterios para identificar líneas celulares y relacionarlos a especie y género (Figura 13.3). Además puede distinguir entre células normales y transformadas. La tinción de los cromosomas aumenta la resolución y especificidad de la técnica.

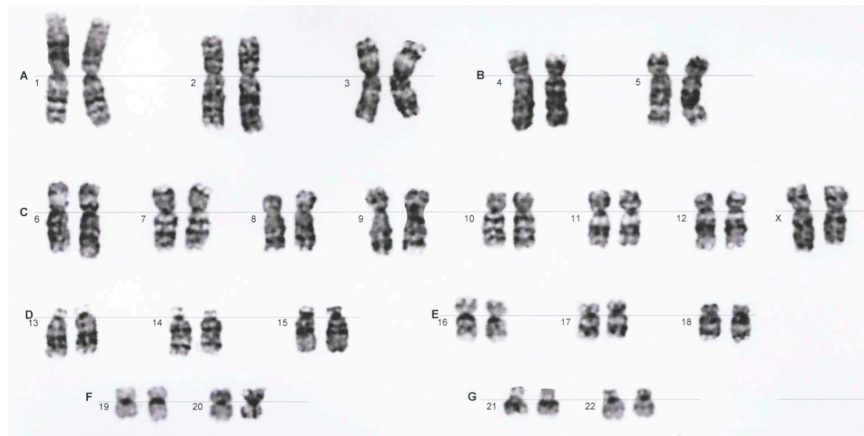


Fig. 13.3 Cariotipo normal femenino de humano 46,XX

Marcadores antigénicos

Las inmunotinciones se encuentran entre las técnicas más útiles disponibles para la caracterización de líneas celulares, pero es esencial verificar la especificidad del anticuerpo que se utilice mediante el uso de controles apropiados. En las inmunotinciones, la visualización de la localización del complejo antígeno-anticuerpo puede lograrse mediante fluorescencia (si el anticuerpo está conjugado a un fluoróforo como fluoresceína o rodamina) o por la deposición de un producto precipitado, resultado de la actividad de una enzima conjugada con el anticuerpo, como la peroxidasa de rábano picante (HRP) o la fosfatasa alcalina. Las inmunotinciones pueden ser directas, es decir, el anticuerpo específico es el conjugado con el fluoróforo o con la enzima, pero es más común el método indirecto, en el que el anticuerpo primario (específico) se une al antígeno en la muestra,

seguido de un segundo anticuerpo, obtenido contra la inmunoglobulina del primer anticuerpo. El anticuerpo secundario puede estar conjugado a la enzima (Figura 13.4) o al fluoróforo (Figura 13.5)

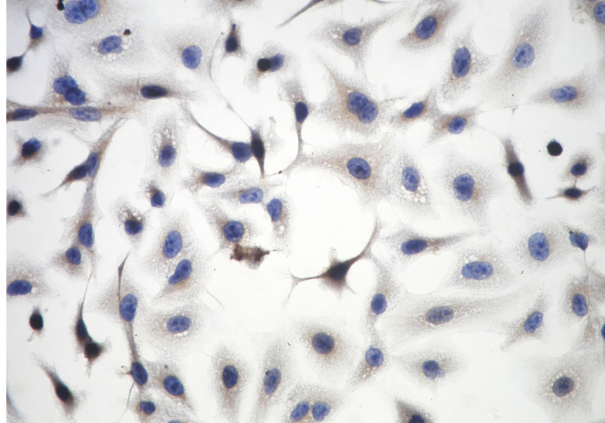


Fig. 13.4 Inmunocitoquímica en células A549 de adenocarcinoma pulmonar. Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal específico de una proteína citoplasmática característica de estas células. El anticuerpo secundario fue un anti-ratón acoplado a HRP. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina.

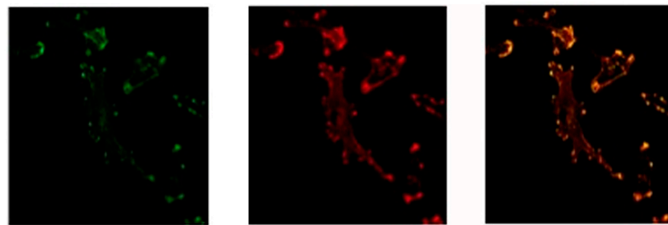


Fig. 13.5 Inmunofluorescencia que muestra la formación de contactos focales en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Se usó anticuerpo anti-paxilina acoplado a FITC (color verde) y faloidina rodaminada (color rojo). El panel de la derecha es el empalme de las fluorescencias y demuestra la colocalización de actina con paxilina.

Actividades sugeridas

- Organizar exposiciones orales sobre diferentes técnicas de caracterización para cultivos celulares.

Bibliografía

R. Ian Freshney. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.

14. Introducción a la ingeniería de tejidos

Objetivo

- Que el alumno conozca el significado de la ingeniería de tejidos y los pasos que se deben seguir para implementarla.

Contenido

Alcances de la ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos tiene como objetivo promover la regeneración funcional del tejido dañado utilizando células cultivadas *in vitro* dentro de andamios 3D para reparar y/o reemplazar tejido dañado de un paciente.

La medicina regenerativa, busca tratar enfermedades y eventos que involucren el crecimiento de células y tejidos; la realización de tejidos en laboratorio y el desarrollo de órganos artificiales, como vasos sanguíneos (Figura 14.1) y piel artificial (Figura 14.2).

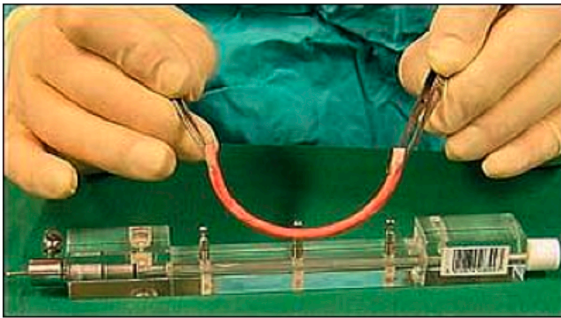


Fig. 14.1 Vaso sanguíneo artificial



Fig. 14.2 Piel artificial

Durante los últimos 50 años uno de los principales logros de la medicina moderna ha sido poder restaurar o mejorar la función de algunos tejidos y órganos lesionados por enfermedades o traumatismos con la cirugía de trasplante a partir de órganos y tejidos extraídos de donantes.

En la actualidad estas técnicas han comenzado a ser no solo complementadas, sino incluso sustituidas exitosamente mediante la ingeniería de tejidos, nueva disciplina que con sus técnicas basadas en el cultivo de células *in vitro* están haciendo posible la producción de tejidos que sustituyan a los lesionados, abriendo la posibilidad de fabricar nuevos órganos. A partir de un pequeño fragmento de tejido se puede lograr restaurar la funcionalidad parcial o total de los tejidos u órganos dañados, como lo ejemplifican los logros alcanzados con los cultivos de piel, córnea, cartílago, hueso, músculo, tejido nervioso y tejido glandular.

Tipos de tejidos del cuerpo humano

Un tejido es la unión funcional de células de un mismo tipo y todo órgano tiene los siguientes 4 tipos de tejidos:

- Tejido muscular: especializado en movimiento
- Tejido nervioso: Inicio y transmisión de señales
- Tejido epitelial: cubrimiento de superficies del cuerpo
- Tejido conectivo: unión y fuerza mecánica

Obtención de un tejido con fines terapéuticos

Como se mencionó, la ingeniería de tejidos busca restaurar, mantener o mejorar la función de un órgano o tejido a partir de la manipulación de matrices tridimensionales, células, factores de crecimiento y diferenciación. En la Figura 14.3 se observa el procedimiento para la obtención de un tejido con fines terapéuticos.

Pasos:

1. Fuente celular: Cultivos primarios o líneas celulares. Para uso terapéutico en humanos las células deben proceder de: Células troncales embrionarias, células troncales de adultos o células autólogas.

Las células troncales tienen la capacidad de auto renovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que están programadas y, por lo tanto, producir uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad. Las células autólogas provienen del mismo paciente, algunas pueden ser troncales. Las células troncales

multipotentes se obtienen o recolectan de la sangre periférica del paciente mediante aféresis; se cultivan y luego se implantan vía periférica al paciente. A estos pacientes se los consideran donantes autólogos, lo que significa que el donante y el receptor son la misma persona, razón por la cual la compatibilidad es exacta.

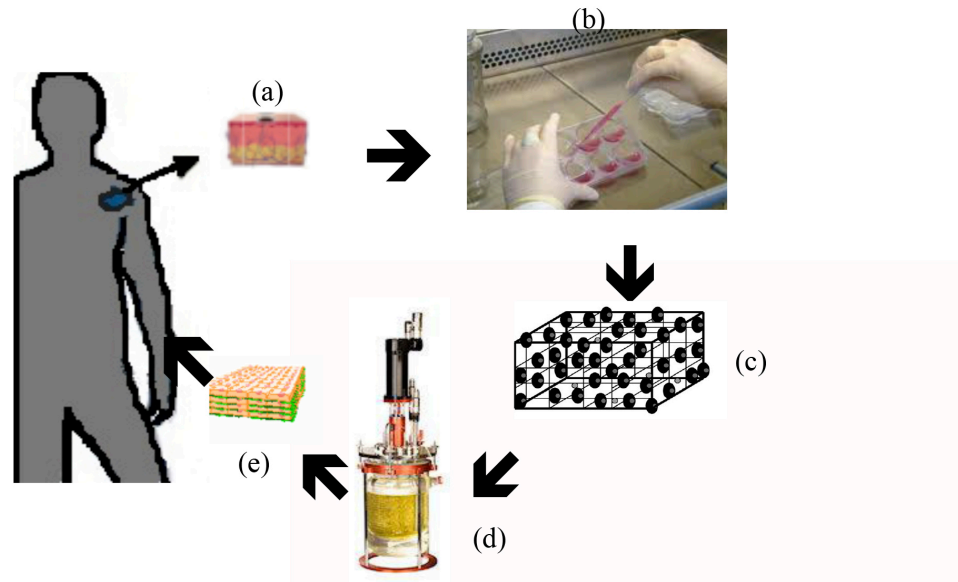


Fig. 14.3 Pasos para la generación de tejidos artificiales con fines terapéuticos. (a) Se obtiene la biopsia del tejido de interés. (b) Se aíslan y cultivan las células de interés. (c) Se forma el constructo (unión entre células y biomaterial de soporte). (d) Se introduce el constructo en un biorreactor que simule las condiciones fisiológicas del tejido en particular. (e) Se obtiene el tejido generado artificialmente, el cual será implantado en la zona de lesión.

2. **Cellularización:** Consiste en realizar el crecimiento celular en andamios generados a partir de biomateriales biocompatibles. Se debe seleccionar el material con base en:
 - Simular las propiedades de la matriz extracelular.
 - Promover la viabilidad celular y la proliferación.
 - Se debe degradar de manera fácil y controlada.
 - Debe tener un alto grado de tolerancia inmune para ser implantado *in vivo*.
3. **Maduración fenotípica:** Depende de los siguientes factores:
 - Colonización exitosa de las células en los andamios,
 - Viabilidad de las células durante su cultivo en el andamio
 - Habilidad de las células de mantener su fenotipo diferenciado
 - Habilidad de las células de interactuar funcionalmente con el biomaterial.

Se debe promover la formación de tejido que funcione fisiológicamente como el tejido normal.

4. Vascularización y microperfusión: Esto se logra a través de un biorreactor, en donde se controlan variables para favorecer el crecimiento del tejido. Se pueden generar estímulos mecánicos, eléctricos y químicos/hormonales para que se pueda dar el desarrollo funcional del tejido. El tipo de estímulos depende de las células de interés y de las funciones que desarrollan en un tejido vivo.

Se debe buscar el desarrollo de sistemas de microcirculación que reproduzcan las condiciones fisiológicas de flujo sanguíneo necesarias para mantener los tejidos vivos. La vascularización e inervación son importantes cuando el tejido crece y madura.

En general, es necesario controlar la biología de la célula, ambiente, transporte y señalización mediante la correcta identificación de la fuente celular, el andamio de acuerdo al tipo de tejido que se quiera generar y proporcionar las señales adecuadas para el crecimiento y proliferación (Figura 14.4).

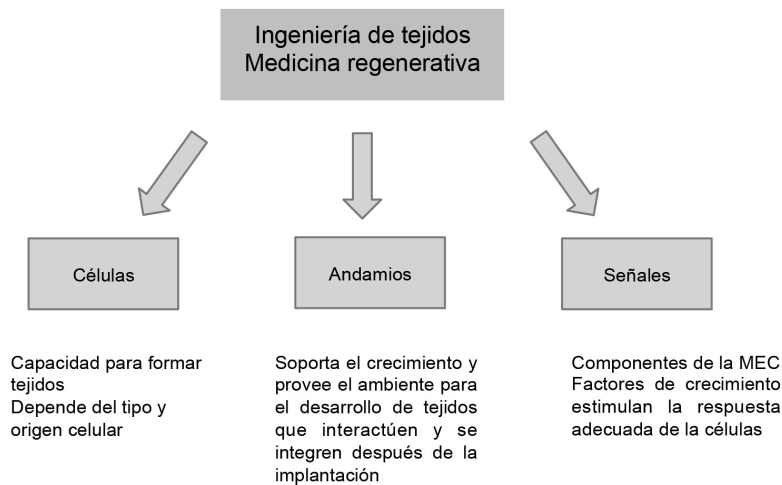


Fig. 14.4 Componentes de la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos

Origen celular para aplicación en ingeniería de tejidos

Se busca que se pueda obtener el número suficiente de células para reparar o regenerar el tejido afectado, de preferencia que promuevan la proliferación celular *in vitro* o cuando sean implantadas en el huésped, que se puedan diferenciar al tipo celular deseado y que sean funcionales, que puedan adoptar la arquitectura 2D o 3D de acuerdo al tejido en donde

sean implantadas soportando las demandas mecánicas del tejido, y que se logren integrar con las células nativas con la adecuada vascularización, inervación y sin rechazo.

Las células troncales son células indiferenciadas que se encuentra en todo el cuerpo después del desarrollo embrionario. Estas células tienen la capacidad de replicarse y convertirse en cualquier tipo de célula especializada. La mayoría de las células adultas del cuerpo son células especializadas, como son las células del corazón, páncreas, riñón, hígado o el cerebro; todas ellas tienen una función específica. Las células troncales no son especializadas, y hasta que reciban una señal para convertirse en un cierto tipo celular, éstas mantienen dicha condición. Lo que hace únicas a las células troncales, es su capacidad de proliferarse en otras células idénticas, además de su especialización específica, es decir, pueden diferenciarse en células especializadas de cualquier órgano o tejido del cuerpo. Las células troncales multipotentes tienen las mismas características básicas que todas las células troncales, son células no especializadas que tienen la capacidad de auto-renovación por largos períodos y se diferencian en células especializadas con funciones específicas. Las células troncales multipotentes se focalizan en producir diferentes tipos específicos de células y varían de las células troncales pluripotentes, ya que éstas pueden dar lugar a casi cualquier tipo de células; o de las totipotentes ya que éstas pueden dar lugar a cualquier tipo de célula, incluyendo el potencial de crear un organismo completo. Las células troncales multipotentes están en la mayoría de los órganos del cuerpo donde reemplazan a las células enfermas o de edad avanzada, y por lo tanto su función es la de reponer las células del cuerpo durante toda la vida de un individuo.

Las células troncales embrionarias se obtienen de la masa celular interna de un embrión de 4 a 5 días de edad y se encargan de formar todos los tipos celulares de un organismo adulto. Pueden mantenerse de manera indefinida en condiciones de cultivo y al dividirse forman una célula igual a la que le dio origen. Se pueden obtener de embriones, mediante técnicas de clonación y forzando la división de óvulos sin fecundar.

Las células troncales adultas (ASCs, por sus siglas en inglés) son unas de las células más abundantes en la médula ósea y probablemente las más estudiadas, existiendo diferentes tipos. Las células troncales hematopoyéticas se utilizan para trasplantes a pacientes con leucemia, generan linajes de células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y linfocitos), mientras que las células troncales del estroma de la médula ósea y células troncales

mesenquimáticas ayudan en la diferenciación de osteoblastos y adipocitos. Las células mesenquimáticas son precursoras del tejido conectivo no hematopoyético y sorprendentemente inhiben la respuesta inmune. Por otro lado, las células troncales embrionarias se toman de la parte interna del blastocito de un embrión muy temprano y permiten entender cómo se desarrollan algunas enfermedades y a su vez permiten evaluar medicamentos. Las células troncales epiblasticas provienen del epiblasto (capa externa del blastodermo que al diferenciarse recibe el nombre de ectodermo y es el responsable de la formación de la epidermis, el sistema nervioso y de los órganos de los sentidos). Las células troncales epiblasticas del ratón tienen muchas similitudes con las células troncales de los humanos, permitiendo el estudio de diversas aplicaciones clínicas.

Los tipos celulares más utilizados para la generación de los diferentes tejidos son:

- Células maduras diferenciadas (somáticas): provienen de ciertos tejidos mediante biopsias autólogas (del mismo individuo) o heterólogas (de otro individuo de la misma especie). Tienen un bajo potencial de diferenciación y proliferación. En ciertos casos son difíciles de obtener.
- Células troncales hematopoyéticas: (HSC por sus siglas en inglés). Se obtienen de médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical y la placenta. Pueden dar origen a diferentes tipos de células especializadas del sistema inmune.
- Células troncales mesenquimales: (MSC por sus siglas en inglés). Son precursoras de todos los tipos de tejido conectivo no hematopoyéticos. Son uno de los tipos celulares más empleados en terapia celular. Son capaces de inhibir la respuesta inmunitaria. Pueden dar origen a células especializadas como los osteocitos, condrocitos y adipocitos.
- Células Troncales Somáticas Adultas: (ASC por sus siglas en inglés). Se dividen y diferencian para formar los tejidos. Pueden reparar o ayudar en la reposición celular y tienen la capacidad de autorenovarse. Son multipotentes, es decir, pueden formar a casi todas las células dentro de un tejido en particular.
- Células fetales: Células germinales embrionarias del primer trimestre o de tejido fetal específico (EG por sus siglas en inglés). Son similares a las células troncales hematopoyéticas y a las mesenquimales, aunque están menos desarrolladas

inmunológicamente y pueden llegar a causar rechazo. Se obtienen de abortos electivos, lo cual en muchos países aún no es permitido.

- Células embrionarias tempranas: Células troncales derivadas de la pre-implantación del blastocisto (ES por sus siglas en inglés). Son células inmaduras, indiferenciadas que permiten la autorenovación o la reparación de un tejido debido a que son capaces de dividirse para producir células hijas idénticas a las células troncales. Son totipotentes, es decir, pueden formar todos los tipos celulares.

Las células troncales proliferan rápidamente y pueden generar tumores. En ingeniería de tejidos, el uso de células somáticas adultas es relevante, debido a que los oocitos realizan un proceso denominado reprogramación que lleva al núcleo de la célula que ya está diferenciada y un estadio de pluripotencialidad y esto puede ser usado en la generación de tejidos.

Las células troncales cultivadas pueden proliferar o diferenciarse. Para diferenciarse necesitan de estímulos como factores de crecimiento. Además, el uso de células humanas y animales en ingeniería de tejidos, requieren de una regulación que justifique el uso, manejo y balance riesgo - beneficio en la manipulación de éstos, considerando las normas éticas, sociales y morales.

Análisis del tejido

Hay que realizar análisis funcionales *in vitro* para evaluar el desempeño fisiológico del constructo (células y andamio).

Se realizan pruebas mecánicas de fuerza, presión y compresión y pruebas de propiedades biológicas/histológicas (expresión y distribución de genes y proteínas).

Luego se realizan pruebas en modelos animales para demostrar la habilidad del tejido artificial de integrarse al tejido huésped y promover la regeneración del tejido dañado.

Posteriormente se realizan pruebas en humanos para comprobar los resultados en animales.

La ingeniería de tejidos *in vivo* comprende la regeneración y reconstrucción de tejidos y órganos dentro del propio organismo. Esta rama médica ha pasado progresivamente por 3 etapas. En la primera se empleaban biomateriales "inertes" con la única finalidad de usarlos como estructuras sustitutivas de algunas partes del cuerpo dañadas.

En la segunda se inició la aplicación de una matriz biodegradable o "andamio biológico" con una estructura porosa, trabecular o reticular, que se coloca en el tejido dañado para promover, en el microambiente apropiado, el crecimiento y propagación *in situ* de las células residentes sanas circundantes o bien de células troncales que pueden implantarse en ese tejido o estar incorporadas al biomaterial que integra el "andamio biológico", con la finalidad de acelerar la regeneración tisular. En esta combinación, las células vivas suministran los componentes biológicos, mientras que el material del "andamio" sirve para apoyar y favorecer la proliferación celular. Estos "andamios biológicos" pueden ser sintéticos o de procedencia natural. La tercera etapa nació con la reciente aparición de la nanotecnología y su aplicación en medicina, que ha llevado al concepto de "nanomedicina". Se ha expuesto que la nanotecnología es un medio excelente para producir nanomateriales que se asemejen a las estructuras biológicas y por lo tanto, sus productos resultan muy prometedores como elementos complementarios para elevar la eficiencia de la terapia celular. Se ha sugerido que la combinación de la terapia celular con la nanotecnología permitiría usar predominantemente la capacidad regenerativa del propio organismo con un empleo mínimo de materiales artificiales.

Por su parte, la ingeniería de tejidos *in vitro* comprende la obtención de tejidos al nivel de laboratorio para su posterior implantación en el sitio dañado. Un ejemplo de esta práctica es la obtención de piel *in vitro*, que ha resultado de utilidad para el tratamiento de lesiones extensas de la piel, como sucede en personas que han sufrido daño por quemaduras. Una aspiración de la medicina del futuro y que hoy parece ciencia ficción, sería la preparación de órganos o parte de ellos *in vitro*.

Los tipos de injertos que se apliquen pueden ser:

- Autotrasplante, autoinjeto o trasplante autólogo
- Alotrasplante u homotrasplante
- Xenotrasplante o heterotrasplante o trasplante xenogénico

En el siguiente esquema se muestran los diferentes orígenes de la matriz extracelular de soporte (Figura 14.5). Las matrices artificiales pueden ser generadas a partir de ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-poliglicólico (PGLA).

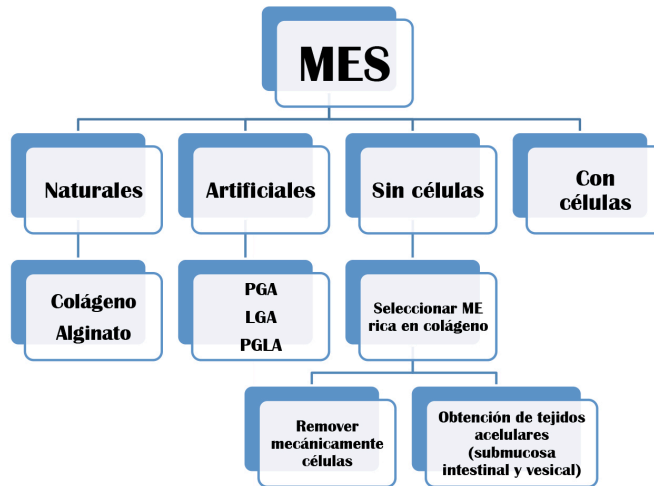


Fig. 14.5 Tipos de origen de matriz extracelular de soporte (MES), utilizados en ingeniería de tejidos

Descelularización

Un tejido descelularizado es aquel al cual se le quitan todas sus células nativas dejando únicamente la matriz extracelular de las mismas, es decir “el molde”, como se observa en la Figura 14.6 para el caso del corazón, hígado, pulmón y riñón. Las actividades celulares como migración, adhesión y crecimiento en tres dimensiones están determinadas por la matriz extracelular, la cual es una red estructural compleja que sostiene y rodea las células del tejido conjuntivo. Su composición puede variar de acuerdo al lugar anatómico y el estado fisiológico de un tejido. La MEC le permite a la célula saber dónde está y qué debe hacer.

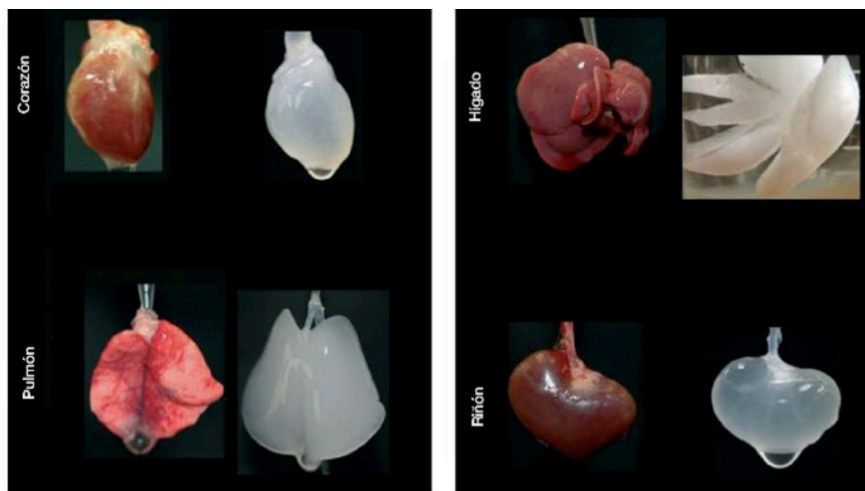


Fig. 14.6 Órganos descelularizados para crecimiento de células y regeneración de órganos completos. Se presentan 4 de los órganos más estudiados en ingeniería de tejidos.

Para recelularizar y generar efectivamente un órgano o tejido, es importante que la morfología y arquitectura de la MEC se mantenga durante y después de la descélularización. Adicionalmente, se necesitan órganos alogénicos (de un donador) para que los componentes de la MEC no causen una respuesta inmune que genere rechazo del órgano.

Retos en la ingeniería de tejidos

- Reconstruir apropiadamente un microambiente para el desarrollo de las propiedades y funciones básicas de los tejidos.
- Escalar para lograr el número adecuado de células para que sean clínicamente útiles.
- Automatizar el sistema de operación a escala clínica.
- Implementar dispositivos automáticos que permitan utilizar terapias basadas en células en los hospitales.

Actividades sugeridas

- Realizar un cuadro comparativo entre los 4 tipos de tejidos que conforman los órganos del cuerpo humano.
- Visitar el atlas: <http://virtual.ujaen.es/atlas/> para identificar los diferentes tipos de tejidos y células que conforman cada órgano del cuerpo humano.
- Realizar una tabla comparativa de diferentes andamios utilizados para generar tejidos, describiendo sus características y composiciones.
- Realizar lecturas sobre aplicaciones en ingeniería de tejidos:
 - Kropp BP, Zwischenberger JB. Tissue-Engineered Autologous Bladders: New Possibilities for Cystoplasty. *Nat Clin Pract Urol* 2006; 3(11): 588-589.
 - Pearson H. Scientists grow bladder replacement in lab. 2006. Disponible en: <http://www.nature.com/news/2006/060403/full/news060403-3.html>.
 - Cressey D. Engineered penis raises reproduction hopes. 2009. Disponible en: <http://www.nature.com/news/2009/091110/full/news.2009.1075.html>.
 - Katsnelson A. Making lungs in the lab. 2010. Disponible en: <http://www.nature.com/news/2010/100624/full/news.2010.314.html>.

- Neergaard L. Scientists Create New Ear Using 3D Printing And Living Cell Injections. 2013. Disponible en: http://www.huffingtonpost.com/2013/02/20/scientists-create-new-ear_n_2728612.html.
- Ingber DE. Bone marrow-on-a-chip unveiled. 2014. Disponible en: <http://wyss.harvard.edu/viewpressrelease/153>.
- The Lancet. Scientists report success growing cartilage to reconstruct nostrils and implanting tissue-engineered vaginal organs into humans. 2014. Disponible en: <http://www.sciencedaily.com/releases/2014/04/140410194352.html>.

Bibliografia

Saltzman WM. Tissue engineering. Oxford Press University; 2004.

Palsson B, Bhatia S. Tissue Engineering. Pearson Prentice Hall Bioengineering; 2004.

Bronzino J. Tissue Engineering. Elsevier; 2008.

15. Aplicaciones terapéuticas

Objetivos

- Que el alumno identifique los requerimientos de crecimiento celular para aplicación terapéutica.
- Que el alumno conozca las principales áreas de aplicación de la ingeniería de tejidos a nivel nacional y mundial.
- Que el alumno identifique las principales aplicaciones e investigaciones realizadas sobre el tema, incluyendo el uso de células troncales.

Contenido

Células humanas

Para hablar de consideraciones terapéuticas en ingeniería de tejidos, no hay que olvidar algunas de las características de las células humanas, que son la fuente celular autóloga ideal para realizar cultivos celulares que puedan crecer sobre andamios para la formación de tejido artificial:

- La densidad celular de los tejidos humanos es de 1 a 3 billones de células / mL.
- El volumen de una persona de 70 Kg es de aproximadamente 70,000 mL.
- El cuerpo humano posee alrededor de 100 trillones de células.
- El volumen de un órgano típico es de 100 – 500 mL.
- Cada órgano contiene de 100 a 1500 billones de células.

Cuando se piensa en realizar un tejido artificial, hay que considerar que el número de células clínicamente aceptables en un tratamiento varía de acuerdo al órgano. Algunos ejemplos son:

- Para trasplantes de condrocitos se necesitan alrededor de 20 - 40 millones de células.

- Para realizar una terapia de linfocitos se necesitan alrededor de 500 billones de células.
- Para realizar un soporte de hígado se necesitan alrededor de 10 billones de hepatocitos.
- Para realizar un trasplante de médula se necesitan alrededor de 200 – 300 billones de células.
- Para realizar un parche de piel se necesitan alrededor de 100 millones de células.
- La densidad de cultivos tisulares debe ser de 10 millones /mL aproximadamente.

Además, es importante tener en cuenta que existen algunas limitaciones en la producción de células ya que las células humanas pueden tener de 30 a 50 duplicaciones dependiendo de la edad del donador. Otro aspecto relevante es que una célula teóricamente puede producir de 10^{10} a 10^{15} células en cultivo.

Debido a todo lo anterior, no es posible que los cultivos celulares en monocapa, como se mencionan en capítulos anteriores, satisfagan las necesidades clínicas que se tienen, ya que como se mencionó las densidades celulares deben ser mucho mayores para alcanzar un fin terapéutico particular. Es por esto que la ingeniería de tejidos busca realizar cultivos sobre andamios en donde las células puedan crecer tridimensionalmente, y con la ayuda de biorreactores y factores de crecimiento, se logre escalar la producción de células humanas y se logre la generación de tejido para una aplicación en particular.

A continuación se analizarán las principales áreas de aplicación médica de la ingeniería de tejidos, de acuerdo al número de casos que se presentan anualmente y a la investigación que se está realizando en diversas partes del mundo para ayudar en la medicina regenerativa.

Áreas de aplicación de ingeniería de tejidos

Las terapias clínicas convencionales para el sustitución de tejidos humanos usualmente han sido implantes de origen no biológico como prótesis, o implantes de origen biológico como los trasplantes de órganos completos. Aún cuando en los últimos años ha aumentado el número de trasplantes de órganos, existen problemas ya que hay escases de donadores y de órganos, además del alto costo del procedimiento y de la terapia de inmunosupresión a la que deben ser sometidos los pacientes de por vida. Es por esto que la ingeniería de tejidos busca imitar el ambiente natural de órganos y tejidos, disminuyendo la inmunosupresión y

disminuyendo los costos del tratamiento. Cada día hay más candidatos a trasplante de órganos o reparación tisular. A continuación se presenta la incidencia de procedimientos médicos realizados para diferentes tipos de tejidos y órganos en Estados Unidos, que es uno de los países en donde se cuenta con datos estadísticos anuales:

Transfusiones sanguíneas: 18,000,000 de procedimientos

Implantes dentales: 10,000,000 de procedimientos

Sustitución de piel en quemados: 2,150,000 pacientes

Daño de tejido cardíaco: 754,000 pacientes

Problemas de páncreas por diabetes tipo I: 728,000 pacientes

Problemas renales: 600,000 pacientes

Reemplazo de articulaciones: 528,200 procedimientos

Debido al aumento en el número de casos de ciertos padecimientos que pueden llevar a la muerte, las principales aplicaciones en ingeniería de tejidos son para la regeneración de: sangre artificial, piel artificial, parches cardíacos, articulaciones y tendones, páncreas artificial y riñón artificial.

Las aplicaciones en ingeniería de tejidos sobre las que más se investiga y trabaja actualmente incluyen los sistemas músculo-esquelético, cardiovascular, tegumentario, gastrointestinal, renal y se trabaja mucho sobre aplicaciones dentales. En este capítulo se analizan algunas aplicaciones y en otros capítulos de este libro se abordan específicamente los sistemas cardíaco y tegumentario, que son de los más estudiados.

Aplicaciones en el sistema músculo-esquelético

Debido al aumento exponencial de la población, las enfermedades y fracturas del músculo esquelético son más numerosas que en años anteriores. Es por eso que recientemente se han desarrollado nuevas técnicas biológicas en las cuales se realizan combinaciones de biomateriales, células y otro tipo de moléculas.

En particular civilizaciones antiguas ya aplicaban de alguna manera técnicas sencillas de Ingeniería de Tejidos. Por ejemplo, romanos y egipcios utilizaban madera como implantes, civilizaciones mexicanas usaban piedras preciosas para sustituir componentes maxilares y algunos huesos. Los hermanos gemelos Damián y Cosme aproximadamente por el año 280 realizaron un reimplante de miembro inferior de un moro a un cristiano egipcio del cual no

se tienen muchos datos. Fue hasta el año 1980 que se realizó el primer implante de cadera total por Themistocles Gluckson, la cual fue hecha de marfil adherida con una mezcla de piedra, yeso y colofonia.

La ingeniería de tejidos, en donde se utilizan técnicas especializadas para la regeneración de tejido a partir de células de la MEC sembradas sobre un andamio bioabsorbible, incorpora factores de crecimiento que modulan la actividad celular. Sin embargo, se necesita de la extracción de tejido nativo a través de una biopsia, para posteriormente aislar algunas células en particular que sean sembradas *in vitro* en una MEC artificial generada a partir de un biomaterial (andamio), luego se estimula el constructo (unión de células con biomaterial) con moléculas bioactivas con la finalidad de producir un tejido nuevo (Figura 15.1).

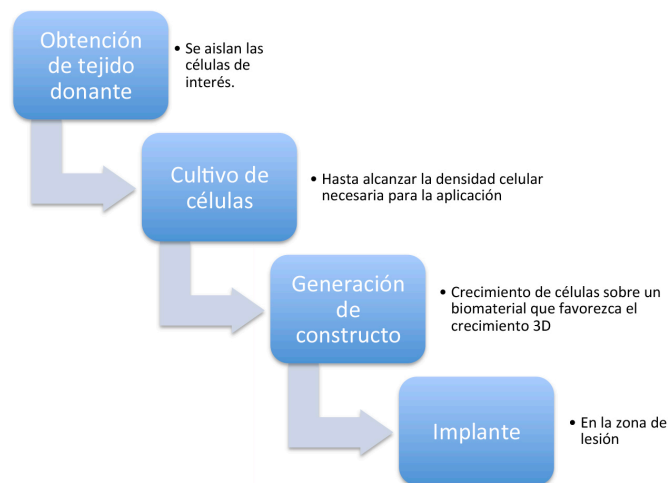


Fig. 15.1 Procedimiento para la generación de tejido artificial

El sistema musculo-esquelético se divide en dos elementos muy importantes: el sistema esquelético y el muscular. Estos dos sistemas trabajan en conjunto para darle ciertas propiedades al cuerpo humano. El sistema esquelético cuenta con los huesos, cartílagos y ligamentos fibrosos. A continuación se mencionan algunos de los componentes del aparato músculo-esquelético y sus funciones:

- Huesos: Tienen la propiedad de dar estructura y movimiento al cuerpo
- Ligamentos: Unen los huesos, rodeando los discos intervertebrales
- Articulaciones: Son conexiones entre los huesos que permiten el deslizamiento de un hueso sobre otro.

- Músculos: Son fibras que originan los movimientos del cuerpo
- Tendones: Son cordones que unen los músculos a los huesos
- Vasos sanguíneos: Transportan oxígeno principalmente y otras biomoléculas a los músculos.
- Nervios: Conectan los músculos y órganos periféricos con el cerebro.

El sistema músculo-esquelético es de gran importancia médica y humana ya que es uno de los principales sistemas que confiere los movimientos coordinados y de locomoción, es por esto que la ingeniería de tejidos se ha interesado mucho en este tema. Algunas de las funciones del sistema óseo son:

- El tejido conectivo duro calcificado tiene como funciones proteger órganos vitales y proveer soporte para la movilidad del cuerpo.
- Almacena calcio y otros iones, células troncales mesenquimáticas y hematopoyéticas.
- Tienen propiedades auto-regenerativas.

Causas de daño del óseo y requerimientos para la generación de andamios y tejido óseo artificial:

Las principales causas de daño del tejido óseo son traumas, osteonecrosis y tumores. Para poder generar tejido óseo el andamio que se genere a partir de un biomaterial para aplicaciones en la generación de tejido óseo artificial debe ser biocompatible, con alta porosidad, debe contar con propiedades mecánicas y ser biodegradable.

Las células troncales mesenquimales han sido muy utilizadas para la generación de tejido óseo artificial, ya que puede diferenciarse a varios tipos celulares; entre ellos osteoblastos y condrocitos. Los factores de crecimiento más relacionados con la osteogénesis son: BMP (proteínas morfogénicas óseas), IGF (factor de crecimiento insulínico), TGF β (factor de crecimiento transformante tipo B), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos).

La producción de mallas porosas y reabsorbibles se ha utilizado para contener las células y favorecer así la formación del tejido óseo, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han diseñado mallas de materiales naturales, de polímeros sintéticos y de fosfato de calcio para la ingeniería de tejidos blandos y duros. Dentro de los puntos importantes que debe tener una malla se encuentran:

- Crear un espacio para que las células puedan sobrevivir
- Dar soporte a tejidos
- Ser biodegradable
- Ser de fabricación accesible

Las principales funciones de la malla son:

- Favorecer la adhesión celular
- Ser un molde temporal para mantener las células y mejorar la regeneración del tejido
- Prevenir la distorsión del tejido circundante
- Servir como barrera para prevenir la fijación del tejido circundante
- Mantener la forma del tejido dañado
- Facilitar los procesos de interacción con la membrana extracelular

Arquitectura y fabricación de mallas:

Se han utilizado varios biomateriales con ciertas ventajas y desventajas:

- Colágeno: ayuda a regenerar tejidos blandos.
- Ácido hialurónico: ayuda a mejorar las propiedades mecánicas, pero por otro lado perjudica la actividad celular y biológica.

Las mallas generalmente tienen una estructura tridimensional (3D), lo más importante que debe tener una malla es la porosidad, el tamaño del poro, la interconexión del poro para permitir el paso del fluido que transporta células, nutrientes y oxígeno; y por último un área superficial para que las células se adhieran y formen un tejido nuevo.

Se utilizan poliésteres biodegradables para la reparación de hueso y cartílago:

- Ácido poliglicólico (PGA)
- Ácido poliláctico (PLA)
- Ácido poliláctico-poliglicólico (PGLA)

Entre los materiales inorgánicos que se han utilizado en la reincorporación de tejido óseo se encuentran:

- Hidroxiapatita
- Tricalcio fosfato

Se han realizado estudios combinando diferentes tipos de células, soportes y factores de crecimiento para realizar autoinjertos o aloinjertos. Además, se han diseñado microsferas

porosas de quitosano y PLGA que liberan factores de crecimiento ya que estos son digeridos rápidamente por el medio.

Actualmente se han realizado combinaciones de células con mallas 3D para trasplantes de condrocitos en matriz bioabsorbible de colágeno, ácido hialurónico y copolímeros de poliláctico y glicónico.

Se han desarrollado implantes de células troncales mesenquimáticas (CTM) que sirven como vehículo, se transforman en fibroblastos y promueven la reparación de ligamento.

Generalmente después de haberse realizado la implantación, se coloca un cemento espaciador para generar un tejido vascularizado. Finalmente se coloca una malla con células cultivadas para estabilizar la mecánica del hueso.

Células troncales

Células con potencialidad terapéutica, también llamadas células troncales: embrionarias, fetales, amnióticas, las de la sangre del cordón umbilical, adultas y células pluripotentes inducidas.

Se han utilizado desde hace 50 años las células provenientes de la médula ósea y las de la sangre del cordón umbilical.

El tratamiento con células troncales se ha catalogado como un nuevo tratamiento de la medicina regenerativa llamado: terapia celular regenerativa.

La medicina regenerativa pone más énfasis en el uso de células troncales para producir tejidos. Según su estado evolutivo, las células trocales pueden clasificarse en embrionarias y adultas. Entre las principales células troncales con potencialidad terapéutica se han señalado las embrionarias, las fetales, las amnióticas, las de la sangre del cordón umbilical, las adultas y más recientemente, las células con características embrionarias que se han obtenido mediante la reprogramación de células adultas y que se han llamado células troncales pluripotentes inducidas. Se ha reportado que la existencia de la célula troncal hematopoyética fue propuesta en el año 1908 por el histólogo ruso A. Maksimow. Desde hace más de 50 años se han estado utilizando clínicamente las células troncales hematopoyéticas provenientes de la médula ósea, y más recientemente las movilizadas a la sangre periférica o las obtenidas de la sangre del cordón umbilical, para el tratamiento de leucemias, linfomas y otros tipos de enfermedades, mediante el trasplante convencional de

células troncales/progenitoras hematopoyéticas. El tratamiento con células troncales ha dado lugar a un nuevo tipo de tratamiento que se puede catalogar como terapia celular regenerativa y que en la actualidad es uno de los temas más excitantes de la medicina contemporánea, como lo fueron en su época sus antecesores representados por la transfusión sanguínea y el trasplante de médula ósea, que son en la actualidad procedimientos habituales y de reconocido valor.

En los últimos años se han obtenido evidencias de que la potencialidad de algunos tipos de células troncales adultas es mayor de lo que se pensaba, pues ellas han mostrado en determinadas ocasiones, capacidad para diferenciarse en células de diferentes linajes. El mejor ejemplo de esta versatilidad celular está representado por las células troncales hematopoyéticas.

Se conoce que la médula ósea contiene células troncales hematopoyéticas y de otros tipos. Entre éstos se encuentran las células progenitoras endoteliales, procedentes del hemangioblasto embrionario, y las células troncales mesenquimales. Estas últimas han adquirido gran relevancia en los últimos años por su potencialidad terapéutica. En el orden práctico, las células mononucleares derivadas de la médula ósea pueden verse como portadoras de un coctel de diferentes células troncales adultas.

Las células troncales derivadas de la médula ósea, con reconocida plasticidad y capacidad proliferativa, pueden circular en la sangre periférica y migrar a diferentes tejidos distantes, en los que pueden asentarse y contribuir a la regeneración de sitios dañados. Además, en las células troncales de la médula ósea se ha identificado un receptor específico para quimiocina el CXCR4 (*CX-chemoquine receptor 4*), que mediante un sistema de "llave/cerradura" se une con la quimiocina SDF-1, factor 1 derivado del estroma (*stromal derived factor 1*). La identificación de este sistema ha contribuido a conocer mejor los mecanismos relacionados con la movilización, migración, quimio-atracción y fijación de estas células a los tejidos.

Se ha comprobado que las células troncales hematopoyéticas pueden producir varios elementos solubles que son esenciales para su acción y que incluyen factores que intervienen en la citoprotección, proliferación, diferenciación y migración celular, angiogénesis, respuesta inflamatoria, asentamiento celular y quizás con otras funciones aún no conocidas.

Todos estos datos aportan evidencias de que las células troncales adultas pueden contribuir a la regeneración de tejidos mediante diferentes acciones, por ejemplo:

1. Diferenciación en células del tejido dañado, lo que podrían hacer mediante transdiferenciación o fusión celular.
2. Asentamiento en el tejido lesionado con emisión de señales que favorezcan el reclutamiento en ese sitio de otras células troncales o progenitoras que participen en la regeneración de los tejidos.
3. Liberación de moléculas solubles con efectos autócrinos/parácrinos.
4. Mantenimiento de su propia autorrenovación, proliferación y funciones.
5. Efecto anti-inflamatorio.
6. Inhibición de la apoptosis.
7. Incremento de la vascularización del tejido dañado.
8. Citoprotección y estimulación de las células sanas presentes en la región lesionada, incluyendo las que pueden estar en un estado quiescente o "dormidas" en un "área de penumbra".

Aplicaciones en gastroenterología: Trasplante de células hepáticas

El trasplante hepático convencional se ha visto reducido en los últimos años a consecuencia del limitado número de donadores, la numerosa lista de espera, la inmunosupresión necesaria durante y después del trasplante, lo que conlleva a altas posibilidades de muerte por alguna infección. Se han buscado nuevas alternativas para resolver dicho problema, tales como: sistemas de soporte artificial hepático, xenotrasplante, tratamiento génico *ex vivo* o *in vivo*, ingeniería de tejidos y el TCH (trasplante celular hepático).

Una de las alternativas más prometedoras al trasplante hepático convencional es el trasplante celular hepático o trasplante de hepatocitos humanos (TCH), el cual consiste en trasplantar hepatocitos humanos totalmente diferenciados a un órgano receptor en cantidad suficiente para que éstos sobrevivan y restauren la función hepática normal, basándose en la capacidad de regeneración. Este procedimiento se encuentra en fase de experimentación clínica. Se ha realizado en pacientes con problemas metabólicos congénitos, falla hepática fulminante y falla hepática aguda o crónica.

Para la regeneración hepática se deben usar hepatocitos adultos debido a que presentan capacidad replicativa y son capaces de restaurar con rapidez la población celular perdida, pueden provenir de órganos de donantes que perdieron la vida. Las fases del trasplante celular hepático son:

- 1.- Aislar los hepatocitos mediante perfusión del hígado con colagenasa. Los hepatocitos deben tener una viabilidad igual o superior al 50%.
- 2.- Preparación de las suspensiones celulares.
- 3.- Implante en el receptor.

Hasta ahora, los mejores resultados de TCH se han obtenido en problemas metabólicos congénitos, que se definen como un grupo de enfermedades genéticas determinadas por el bloqueo de un paso metabólico. La causa del bloqueo es la mutación de genes responsables del funcionamiento de dicho paso metabólico, porque el producto génico (que puede ser una enzima o coenzima), esté cualitativa o cuantitativamente afectado.

Aplicando el TCH se ha logrado estabilidad en la actividad enzimática y disminución de los niveles séricos de bilirrubina. En casos con alteraciones en el ciclo de la urea se ha logrado la disminución de amonio y la estabilización metabólica con mejoría psicomotora.

Las fuentes celulares para la sustitución hepática o para la ingeniería de tejidos incluyen: células troncales hematopoyéticas, células progenitoras ovales, hepatocitos adultos, células derivadas de hepatoblastoma, entre otras. En la Tabla 15.1 se resumen las fuentes celulares para la ingeniería de tejido hepático.

Célula	Fuente	Aplicación	Ventajas	Desventajas
Hepatocitos humanos	Deshecho de tejido humano hepático	Hígado bioartificial, dispositivos implantables, trasplante de células	Alta grado de compatibilidad	Reducida disponibilidad, proliferación pobre <i>in vitro</i>
Hepatocitos porcinos	Hígado porcino	Hígado bioartificial y dispositivos implantables	Mayor disponibilidad en comparación con los hepatocitos humanos	Transmisión de enfermedades, incompatibilidad proteína-proteína, posible respuesta inmune
Líneas celulares de hepatocitos humanos derivados de tumor	Líneas celulares derivadas de carcinoma hepático humano	Hígado bioartificial y dispositivos implantables	Fácil almacenamiento, mantenimiento y proliferación <i>in vitro</i>	Tumorigenicidad y reducción en el rendimiento funcional
Línea celular inmortalizada de hepatocitos humanos	Hepatocitos humanos inmortalizados por transfección de genes	Hígado bioartificial y dispositivos implantables	Fácil almacenamiento, mantenimiento y proliferación <i>in vitro</i> ,	Tumorigenicidad potencial, preocupaciones de

			tumorigenicidad reducida en comparación con tumores derivados de líneas celulares	seguridad a largo plazo, rendimiento funcional reducido.
Células troncales adultas (MSCs)	Tejidos adultos	Dispositivos implantables y trasplante de células	Disponibilidad ilimitada y menos problemas de seguridad	Transdiferenciación, baja eficiencia de los protocolos existentes y mayor duración de la diferenciación hepática
Células fetales	Hígado fetal humano	Trasplante de células	Puede diferenciar a amabos hepatocitos y células biliares	Difícil aislamiento, disponibilidad limitada y potencial tumorigeno
Hepatocitos fetales humanos	Hígado fetal humano	Hígado bioartificial, dispositivos implantables, trasplante de células	Fácil aislamiento de células y puede someterse a pocas divisiones celulares <i>in vitro</i>	Baja eficiencia funcional, menor disponibilidad, preocupaciones éticas y posible tumorigenicidad
Hepatoblasto	Hígado fetal humano en una etapa temprana de la gestación	Trasplante de células	Alta proliferación <i>in vitro</i>	Cuestiones éticas y disponibilidad limitada
Células troncales embrionarias	Líneas celulares pluripotentes derivadas de embriones humanos o células adultas genéticamente modificadas	Hígado bioartificial y dispositivos implantables	Disponibilidad ilimitada y proliferación indefinida	Cuestiones éticas y posible formación de teratomas

Tabla 15.1 Fuentes celulares para la ingeniería de tejido hepático.

Los hepatocitos son células dependientes de anclaje y si no cuentan con la composición de MEC adecuada que permita las interacciones proteína-célula o contactos entre célula-célula pierden su función específica. Debido a esto, se ha desarrollado una gran variedad de andamios 3D para proporcionar la MEC inicial que dará soporte a las células, así como la micro o macro estructura de la ingeniería tisular del hígado.

El hígado es un órgano altamente vascularizado, por lo tanto el andamio debe estar dotado de las siguientes características específicas: 1) química de la superficie a favor de la unión celular, la diferenciación y la proliferación, 2) ser biodegradable para lograr la regeneración del tejido, 3) poseer estructuras porosas interconectadas con el fin de facilitar el suministro de nutrientes y de oxígeno y la eliminación de desechos, 4) tener canales vasculares

internos predefinidos para apoyar la vascularización y 5) no ser tóxico en sí mismo ni en sus productos derivados.

Las técnicas para que el andamio tenga entre un 90-95% de porosidad son las de liofilización y el lavado de sales, las cuales están sujetas a la generación de poros al azar, lo que significa que no se puede controlar el tamaño de poro. Además, la red no tiene que estar totalmente interconectada, ya que las células no podrían migrar profundamente en el andamio. Algunas investigaciones muestran que el máximo espesor de la red debe estar entre 150-200 μm .

En el caso de la falla hepática fulminante que es un tipo de hepatitis poco frecuente la cual se caracteriza por un avance rápido y presenta necrosis del hígado, los trasplantes celulares buscan asegurar la supervivencia del paciente hasta conseguir un órgano para trasplante. Con esta técnica se ha observado mejoría en el grado de encefalopatía hepática (debida a la toxicidad ya que afecta tanto al sistema nervioso periférico como al cerebro) y una disminución en los niveles de amonio. Principalmente se infunden las células por la arteria esplénica o por la vena porta, con un volumen aproximado del 5% de la masa hepática del paciente. En diferentes casos se han visto mejorías considerables tanto en la función hepática como en la disminución de valores de bilirrubina, amonio, etc. Pero cabe destacar que se han presentado complicaciones importantes que han llevado a la muerte a los receptores de estos injertos celulares. En las valoraciones clínicas han demostrado que se requieren varias infusiones, debido a que después de 3 a 6 meses se hace presente una disminución de la función metabólica adquirida posiblemente por rechazo o muerte de las células trasplantadas. Este tratamiento no solo es menos invasivo, sino que es de menor costo. Además, las células utilizadas son maduras y completamente diferenciadas.

Existen limitantes en los trasplantes de órganos sólidos, como es el caso de la supervivencia tanto del injerto como del paciente. Esto se debe principalmente a enfermedades recurrentes que atacan al paciente debido a la supresión inmune a la que se somete al paciente para evitar en lo mínimo el rechazo del injerto, lo cual lo deja desprotegido. Por otro lado, la respuesta inmune al injerto lo puede dañar de forma irreversible teniendo que removerlo para evitar complicaciones. Los xenoinjertos que se usan para trasplante hepático provienen de cerdos, los cuales pueden tener infecciones que se transmiten a los pacientes. Para disminuir el rechazo a los injertos antes mencionados, se ha recurrido a cerdos con genes

modificados, con lo que se reduce la frecuencia con la que se presenta el rechazo hiperagudo. Aunque siguen existiendo problemas de otra índole como lo son las restricciones fisiológicas, respuesta inflamatoria, pérdida de la coagulación por la incompatibilidad tanto con cerdos como con primates. Se puede presentar la trombocitopenia (sangrados espontáneos). La falta de conocimiento sobre el mecanismo de acción de algunas proteínas propias de los cerdos se ha aunado a casos de insuficiencia hepática.

En el caso de los islotes pancreáticos, se ha recurrido a otra técnica conocida como trasplante celular (en enfermedades metabólicas). En este caso los pacientes muestran beneficios a corto plazo. Los islotes son difundidos por la vena porta para que lleguen al mismo páncreas y reemplacen la función de los islotes nativos. Para los hepatocitos existen ciertos problemas como los defectos en el ciclo de la urea, disminución de la funcionalidad al pasar un año de que fueron trasplantados.

En el trasplante celular además existen pocas fuentes para obtener hepatocitos viables (actualmente se obtienen de órganos descartados para trasplante y tejido resultante de reducciones hepáticas).

Aplicaciones en el sistema renal

La prevalencia de la enfermedad renal crónica (ERC) ha impulsado el desarrollo de estrategias de tratamiento eficaces. La ERC es la pérdida lenta de la función de los riñones con el tiempo. Es causada comúnmente por la diabetes y la hipertensión arterial. Como consecuencia se acumula líquido y productos de desecho en el cuerpo, por lo que afecta el funcionamiento del cuerpo.

Para los pacientes con enfermedad avanzada, las terapias se enfocan en reemplazo renal, como la diálisis peritoneal o la hemodiálisis, con el inconveniente de que no puede restaurar funciones homeostáticas, de resorción, metabólicas, endocrinas e inmunomoduladoras, y como resultado de estas deficiencias aumentan por otro lado las enfermedades cardiovasculares o la muerte.

Para la ERC avanzada el único tratamiento restaurador disponible es el trasplante alogénico, pero la escasez de donantes, la morbilidad quirúrgica y la necesidad de la inmunosupresión de por vida limitan significativamente la aplicación clínica. El primer

trasplante renal lo llevo a cabo el doctor Joseph Murray. Con el trasplante se reducen los costos del tratamiento, aumenta la esperanza de vida y mejora la calidad de vida en comparación con la diálisis.

Las tecnologías emergentes en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos se esfuerzan para hacer frente a estas limitaciones y tienen como objetivo producir un riñón de bioingeniería capaz de restaurar la función renal en los pacientes con enfermedad en fase terminal.

Opciones de tratamiento basadas en células

Una de las opciones para recuperar las funciones renales consiste en conseguir que de forma natural, o lo más cercano a esto por medio de células autógenas, se logre regenerar el órgano. En 1953 J. Oliver logró demostrar que esto era posible. Su experimento demostró que por medio de un tipo de tejido epitelial, el paciente logró regenerar una parte dañada. Estudios posteriores demostraron que la mesénquima del túbulo proximal, células epiteliales tubulares, la cápsula de Bowman, papila renal y el estroma cortical, contienen células capaces de regenerar.

Otra posible fuente para la regeneración renal son las células de origen embrionario. Este tipo de células son pluripotenciales; es decir, pueden generar cualquier tipo de célula al diferenciarse, sin importar de qué capa embrionaria provengan. Para esto necesitan de un proceso de diferenciación que se ve mediado por diversos factores del microambiente, desde moléculas presentes en la MEC, hasta la comunicación paracrina.

Para lograr esto en los laboratorios muchas veces se utilizan factores de nefrogenación *in vitro*, esto es, que usan extractos de estos factores para luego reimplantarlos en el área dañada. Uno de los grandes problemas de estos tratamientos es que se ha notado una alta probabilidad de generación de tumores, así como el polémico hecho de su origen.

Para evitar estas controversias, otra opción es el uso de células de médula espinal. Estas por el contrario sólo son multipotenciales; esto es, que no pueden diferenciarse en cualquier tejido pero sí en una amplia variedad de estos. Se ha demostrado que estas células promueven la vascularización, reducen la inflamación, inhiben la apoptosis y mejoran la proliferación. Aún no se sabe si estas células se diferencian *in situ* o bien emiten señales que ayudan a la regeneración. Otro inconveniente que se está estudiando es que estas

células podrían ser las que generan las enfermedades renales desde el principio, por lo que su implantación podría generar mayores prejuicios que beneficios.

Un posible sustituto para esto son las células provenientes del líquido amniótico, las cuales tienen acciones de origen medular, mayor eficiencia y menos problemas. El inconveniente es su obtención y el poco desarrollo que se ha presentado en esta área.

Finalmente, se encuentran las células que son inducidas a ser desdiferenciadas para posteriormente volver a implantarse y diferenciarse en otra parte del organismo. Esto se consigue al infectarlas con factores virales de retrotranscripción. Este proceso genera muchas ventajas, como su fácil obtención, fácil diferenciación y presentar menor tendencia a generar anomalías que puedan llevar a cáncer o a tumores. Su desventaja es que se ha observado que generan una respuesta inmune mucho mayor, llegando a atacar el tejido sano.

Bioingeniería de órgano completo

Los investigadores han reconocido que la MEC es crucial para el desarrollo del riñón y de su reparación. La MEC es una estructura tridimensional que influye en la organogénesis y la reparación por las siguientes razones:

- a) Proporciona un andamio 3D para la organización espacial de las células.
- b) Secreta y almacena factores de crecimiento y citoquinas.
- c) Regula la transducción de señales.

Los componentes de la MEC son: colágeno tipo IV, entactina, proteoglicanos y las lamininas que interactúan con las integrinas de la superficie celular; estas últimas son cruciales para la proliferación del tejido metanéfrico, la ramificación y la epitelización durante la organogénesis.

Algunas de las ventajas de la MEC innata para estos fines son:

- a) Característica bioquímica, geométrica y espacialmente ideales, por ser biocompatible, tiene componentes básicos, factores de crecimiento y citocinas.
- b) Mantiene una intacta y patente revascularización, que sostiene la presión arterial fisiológica cuando se implantan *in vivo*.
- c) Capacidad de conducir a la diferenciación.

Andamios de MEC de animal entero u órganos de cadáver-humanos pueden ser generados a través de la descelularización a base de detergente. La descelularización es capaz de eliminar ADN, material celular y antígenos de superficie celular del andamio de MEC, preservando al mismo tiempo los sitios de unión, la integridad estructural y canales vasculares.

La descelularización completa es esencial ya que el material celular residual puede contener epítomos antigénicos (macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia específica a la que se unen los anticuerpos, receptores de las células B o de células T) que desencadenan respuestas inflamatorias y comprometen la posterior recelularización. Se requiere una esterilización eficaz de la MEC, para la cual se utiliza óxido de etileno o ácido peracético que no desnaturalizan las proteínas o factores de crecimiento, aunque el riesgo de contaminación viral permanece.

Después de la descelularización viene el proceso de recelularización, que puede llevarse a cabo con células troncales o progenitores renales.

Se ha reportado la recelularización exitosa de los andamios de riñón de rata intactos con células troncales embrionarias murinas, xenotransplantados y perfundidos a través de la vasculatura innata.

El andamio de riñón descelularizado apoyó exitosamente el crecimiento y la migración de las células troncales embrionarias xenotransplantadas dentro de estructuras glomerulares, vasculares y tubulares. Dentro de 10 días de la siembra, estas células presentaron cambios morfológicos brutos consistentes con la maduración epitelial, así como marcadores inmunohistoquímicos de diferenciación renal.

El protocolo de descelularización conserva la permeabilidad y las estructuras jerárquicas de ramificación de la red vascular, que es imprescindible para su posterior trasplante, perfusión y recelularización.

Existen protocolos eficaces para descelularización renal en ratones y cerdos pero no para humanos, por eso queda la incógnita si la MEC de riñón descelularizado puede soportar la proliferación y diferenciación de células troncales en los 26 tipos de células que comprenden el riñón humano maduro, para establecer funciones homeostáticas, de resorción, metabólicas, endocrinas e inmunomoduladoras. Y finalmente, no está claro si la

recelularización de perfusión es suficiente para evitar los efectos trombogénicos de la estructura de colágeno observado después de volver a la implantación.

Actividades sugeridas

- Lectura: Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. Porfirio Hernández Ramírez. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional. 2009; 25(1).
- Lectura: Capítulo 3 del Libro *Foundations of Regenerative Medicine. Stem Cells Research*. Elsevier, 2008.
- Discusión en clase de notas periodísticas de divulgación científica:
Morin M. Pig bladders help wounded humans regrow damaged muscle, scientists say. 2014;[2 páginas]. Disponible en: <http://www.latimes.com/science/la-sci-muscle-repair-20140501-story.html> Consultado Junio 14, 2014.
Khademhosseini A. Building a Better Blood Vessel. 2014;[2 páginas]. Disponible en: http://www.brighamandwomens.org/About_BWH/publicaffairs/news/PressReleases/PressRelease.aspx?PageId=1781 Consultado Junio 14, 2014.
- Buscar aplicaciones de las células troncales en tratamiento de otras enfermedades.

Bibliografía

- Saltzman WM. Tissue engineering. Oxford Press University; 2004.
- Palsson B, Bhatia S. Tissue Engineering. Pearson Prentice Hall Bioengineering; 2004.
- Bronzino J. Tissue Engineering. Elsevier; 2008.
- Estrada C, Paz AC, López LE. Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas: EIA 5: 93-100; 2006.
- Hernández Ramírez P. Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional. 25(1); 2009.
- Atala A, Lanza R, Thomson JA, Nerem RM. Foundations of Regenerative medicine. Elsevier; 2008.

Carbone M, Lerut J, Neuberger J. How regenerative medicine and tissue engineering may complete the available armamentarium in gastroenterology. *World Journal of Gastroenterology*. 18(47): 6908-17; 2012.

Jiankang H, Dichen L, Yaxiong L, Bo Y, Bingheng L, Qin L. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin porous scaffolds with predefined internal microstructures. *Polymer*. 48: 4578-4588; 2007.

16. Biomateriales aplicados a la medicina

Objetivos

- Que el alumno conozca los diferentes tipos de biomateriales, sus características y propiedades.
- Que el alumno identifique las principales aplicaciones de los biomateriales en ingeniería de tejidos.

Contenido

Introducción

Los biomateriales son productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional y aceptable fisiológicamente. Son temporal o permanentemente implantados en el cuerpo y tratan de restaurar un defecto existente o conseguir la regeneración tisular. Es un campo multidisciplinario, que tiene varios objetivos como se muestra en la Figura 16.1.



Fig. 16.1 Áreas involucradas en la generación de biomateriales en medicina

Es importante estudiar los biomateriales que serán colocados dentro del cuerpo humano por 3 razones fundamentales:

- Control de calidad, tanto en estructura como en superficie.

- Propiedades mecánicas, definiendo parámetros que permitan evaluar las interacciones entre un biomaterial con un sistema biológico.
- Análisis de su comportamiento después de la implantación.

Requisitos del biomaterial para utilizarse dentro del cuerpo humano

- Biocompatibilidad: capacidad del material de interactuar con tejidos vivos sin causar daño, o con muy pocas reacciones biológicas.
- Tolerancia: debe ser aceptado por el organismo receptor sin generar fuertes reacciones biológicas.
- Bioestabilidad tanto a corto como a largo plazo: debe ser químicamente estable o biodegradable en productos no tóxicos durante su tiempo de uso dentro del organismo.
- Mantenimiento de sus propiedades y estructura químico-física en el entorno biológico durante el tiempo que permanezca en el organismo.
- Poseer unas propiedades mecánicas y químicas específicas que aseguren la función para la cual se diseñan.
- No ser tóxico, ni carcinógeno.
- Ser químicamente estable, o biodegradable en productos no tóxicos.
- La resistencia y propiedades mecánicas, características superficiales, el tiempo de fatiga (tiempo necesario para que se formen fracturas que puedan hacer que el material se rompa), y el peso deben ser adecuados de acuerdo a la aplicación.
- Diseño, tamaño y forma adecuados.
- Precio reducido, fabricación reproducible y procesamiento fácil para su producción en gran escala.

Idealmente los biomateriales deben tener una superficie química dinámica que posibilite cambios histológicos en la interfase del implante con el tejido biológico; o deben ser inertes para que no perturben histológicamente la secuencia de reacciones que se producen una vez implantados en el organismo. Sin embargo, el comportamiento real de los biomateriales involucra un desgaste corrosivo (por la actividad química de alguno de los componentes), fatiga superficial (formación de pequeñas fracturas que pueden hacer que se rompa el

material), o desgaste abrasivo (en donde las partículas de una superficie son desplazadas hacia otra a la que se adhieren).

Aplicaciones de los biomateriales en medicina:

- Trasplantes de órganos,
- Sustitución de válvulas cardíacas,
- Tratamiento de quemados con una piel biotecnológica.
- Implantación de miembros amputados que pueden moverse con el pensamiento (biomateriales inteligentes)
- Vejigas artificiales creadas con células de los propios pacientes
- Ojo biónico
- Suturas biodegradables
- Aplicaciones odontológicas y oftalmológicas
- Soportes para liberación de medicamentos

Tipos de biomateriales

La clasificación de los biomateriales puede realizarse atendiendo a su comportamiento cuando se implantan o bien atendiendo a su naturaleza química. Se clasifican en:

- Metales
- Cerámicas
- Polímeros

Metales:

Han sido utilizados en aplicaciones médicas desde el siglo XVI, en reparaciones dentales e inmovilización de fracturas óseas. Se han utilizado en la fabricación de prótesis y órtesis, o para la fabricación de implantes utilizados en la estabilización y ayuda al proceso de reparación de un tejido.

Pueden sufrir procesos de corrosión liberando productos que generen una reacción tisular o afectar directamente el tejido circundante por alteración del entorno químico generando cambios electroquímicos que afecten el comportamiento o la conducta de las células, modificación del metabolismo celular mediante la liberación de iones metálicos, o generando una reacción inflamatoria crónica por la liberación de productos de la corrosión.

Cerámicas:

A diferencia de los metales, las cerámicas son materiales químicamente inertes, los cuales no desencadenan respuestas indeseadas en el tejido con el cual se relacionan, además no son susceptibles al ataque microbiano y son químicamente estables en presencia del oxígeno, de medios ácidos, alcalinos, salinos y disolventes orgánicos. Estas características favorecen el uso de las cerámicas para la generación de prótesis óseas. Las cerámicas porosas posibilitan el crecimiento del tejido circundante y la adhesión celular al interior a través de sus poros. La existencia de los poros permite la vascularización del implante, por lo que sirven como excelentes modelos en procesos de osificación. El gran problema de estas cerámicas es la debilidad mecánica, sobre todo cuando se trata de productos de elevada porosidad. Ejemplo de estas cerámicas son los corales y la alúmina, pero debe ser tratada para adquirir la porosidad característica de estos compuestos.

Las cerámicas bioactivas muestran una determinada reactividad química del implante frente a los tejidos circundantes. La gran ventaja de este tipo de implantes es que se pueden reabsorber a largo plazo desapareciendo los potenciales problemas de biocompatibilidad. Este tipo de cerámicas son utilizadas frecuentemente para la preparación de implantes que induzcan y posibiliten la formación de estructuras óseas; normalmente se destinan a aplicaciones ortopédicas. El principal inconveniente que presentan es que los iones liberados durante el proceso de reabsorción deben encontrarse a una concentración compatible con el medio fisiológico circundante y, a la vez, no resultar tóxicos. Ejemplos de estas cerámicas son la hidroxiapatita y los vidrios bioactivos.

Polímeros:

Las propiedades físicas, el comportamiento y estabilidad química de este grupo de biomateriales dependen de un conjunto de variables tales como la composición química del polímero y su grado de entrecruzamiento molecular. Una de las ventajas que presentan es que se les puede dotar de una amplia variedad de propiedades por introducción de aditivos químicos, macromoléculas o segundas fases. La forma, la estructura, la textura, la rigidez y la flexibilidad son propiedades que *a priori* pueden determinar su utilización. En general poseen una alta biocompatibilidad al ser biodegradables. Los polímeros tienen diferentes aplicaciones en odontología, ortopedia, como suturas, adhesivos tisulares, se utilizan en el

transporte y liberación de fármacos, en regeneración tisular, y en la generación de andamios para ingeniería de tejidos.

Los polímeros son el principal tipo de materiales empleados en la ingeniería de tejidos blandos. Se dividen en naturales y sintéticos, así como en degradables y no degradables. Los biopolímeros naturales poseen biocompatibilidad y resorción, sin embargo tienen baja capacidad de procesamiento y propiedades mecánicas pobres, mientras que los polímeros sintéticos superan lo último, pero generan respuesta inmune debido a la degradación de productos ácidos.

Tipos de pruebas a los biomateriales

Una vez desarrollado un biomaterial para aplicaciones médicas, debe ser sometido a un conjunto de pruebas para evaluar su correcto funcionamiento antes de ser implantado en un ser vivo. Estas pruebas incluyen:

- Simulaciones biomecánicas: para evaluar el esfuerzo al cual será sometido el material en condiciones reales de funcionamiento.
- Modelos *in vitro*: en cultivos celulares, los cuales permiten determinar cómo responden las células a la presencia de diferentes materiales, evaluando cómo se produce la adhesión, proliferación, y crecimiento celular en presencia del material; así como también las actividades enzimáticas y metabólicas que puedan alterarse por la presencia del material objeto de estudio.
- Ensayos toxicológicos: para evaluar que no generen productos tóxicos para el organismo.
- Ensayos de biocompatibilidad: para determinar la respuesta del organismo a la implantación del biomaterial. Se analiza el tipo de células presentes en el implante y sus alrededores, y se evalúa si hay un proceso inflamatorio o de rechazo del material. Lo que se busca es una intergración entre el biomaterial y el tejido adyacente.
- Implantación en animales de experimentación: Se realizan pruebas en modelos animales para evaluar la integración, inflamación, rechazo, o cualquier otro tipo de reacción del biomaterial con el ser vivo. Estas pruebas se realizan antes de realizar estudios en seres humanos. Una vez se garantice la biocompatibilidad y que el

bimaterial no sea tóxico para el ser vivo, se puede proceder a realizar ensayos clínicos.

- Pruebas clínicas: Se realizan en pacientes mediante protocolos aprobados por comités de ética, en donde se busca corregir un defecto existente, o la regeneración tisular.

Generación de andamios para cultivos celulares

Para la ingeniería de tejidos es importante el desarrollo de andamios que imiten el microambiente del tejido y que promuevan su regeneración. Se busca la generación de andamios 3D, que promuevan la adhesión celular, interacción con la matriz extracelular, proliferación celular y diferenciación.

Se estudian diferentes técnicas de microfabricación, para generación de estructuras microporosas 3D, transporte de nutrientes e infiltración celular; y técnicas de nanofabricación, para crear superficies con propiedades químicas específicas y nanotopografía.

Hay diferentes tipos de andamios: amorfos, basados en hidrogeles, fibrosos y con geometría y estructura controlada. En la Figura 16.2 se observa un ejemplo de andamio de alginato para crecimiento de células cardíacas.

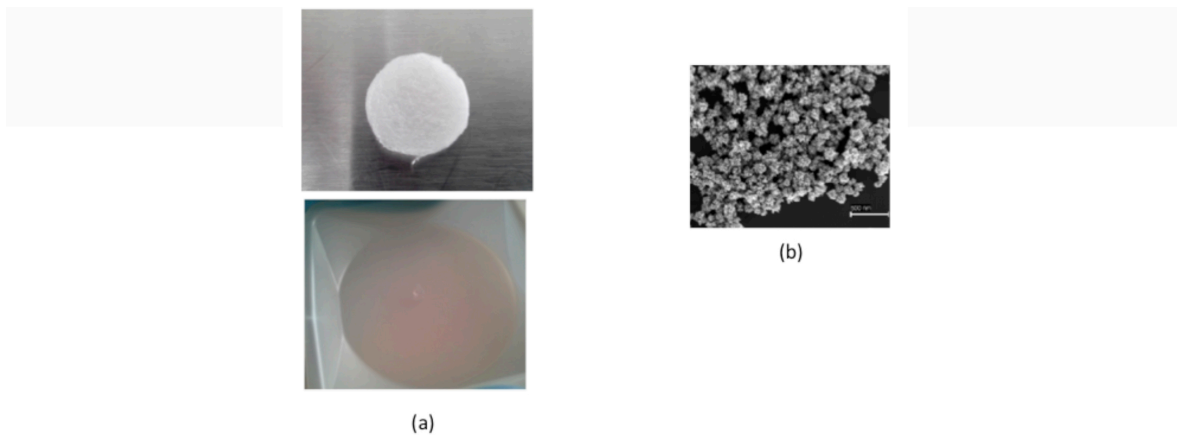


Fig. 16.2 Ejemplo de (a) andamios de alginato para aplicaciones en cultivos celulares y (b) las nanopartículas de oro que pueden introducirse en el biomaterial para mejorar propiedades de conductividad.

En la creación de un andamio se debe tomar en cuenta:

- Tejido de origen.

- Propiedades mecánicas.
- Interacciones célula-célula y célula-matriz.
- Estructura de los poros para el transporte de nutrientes.

En los andamios de fibras se busca:

- Porosidad > 95%
- Estructuras isotrópicas
- Tamaño de fibras es homogéneo
- Distribución de los poros
- Características topográficas similares a las de la MEC.

Existen varios efectos de los andamios en el comportamiento del cultivo celular, entre los que se encuentran:

- Depende del tipo de cultivo (2D o 3D)
- Propiedades de superficie (Química, geometría y topografía)
- Funcionalización de las moléculas biológicas

Afectando la adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y morfogénesis.

Una vez generados, se evalúan varias propiedades de superficie, como:

- Nanoescala (<1 μm), microescala (1-1000 μm)
- Porosidad
- Tamaño de poro
- Diámetro de las fibras
- Macroescala (>1 mm) dimensión del andamio y configuración.
- Degradación, cargas iónicas, fuerza mecánica y la conductividad eléctrica (si aplica).

Existen estudios que demuestran los beneficios del crecimiento celular sobre ácido poliláctico-poliglicólico (PGLA) y tereftalato de polietileno (PET) en andamios 3D (Figura 16.3) vs. 2D a nivel microestructural, morfológico, de adhesión y de organización celular, entre los que se encuentran:

- 3D presenta alta densidad celular a diferencia de los 2D
- 3D aumenta la proliferación, interconectividad de la estructura para la difusión de nutrientes.
- 3D mejor distribución espacial y migración.

- En los andamios fibrosos, se favorece la adhesión celular, formación de puentes y agregados celulares entre las fibras.

Se evidenció que el crecimiento celular, la organización espacial y la migración afectan la proliferación, función, expresión de genes y la diferenciación celular.

La proliferación sobre andamios 3D es lenta. Se evalúa la interacción, señalización, y funcionalidad celular con la ayuda de biorreactores y de microfluidos para proveer al tejido todas las condiciones necesarias para su aplicación médica.

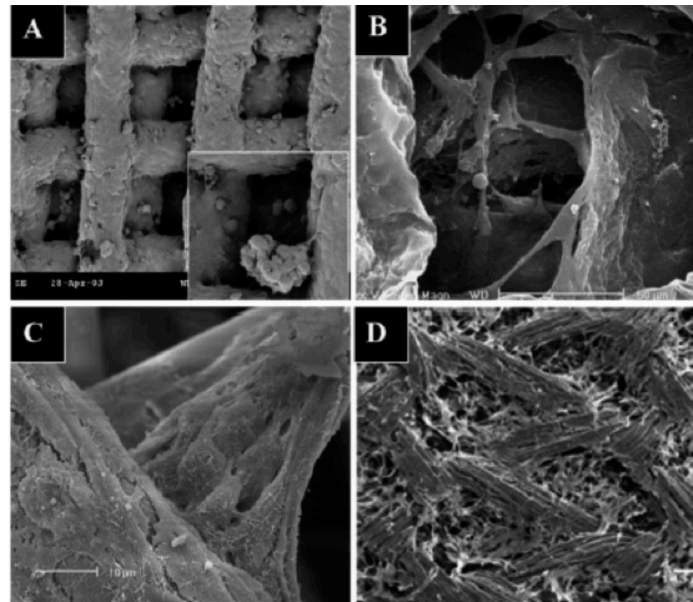


Fig. 16.3 Fotografías con microscopía electrónica de barrido de cultivos 3D. A) células de cáncer de mama MCF-7 sobre andamio con recubrimiento de PGLA; B) astrocitos sobre andamio con PGLA, C) hepatocitos sobre andamio con PET; D) células troncales mesenquimales sobre andamio de colágeno con PGLA.

El quitosano y la gelatina son de los biomateriales más utilizados en ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y bajo costo. Pese a las grandes ventajas que tienen los biomateriales de origen biológico, también se han estudiado polímeros sintéticos biodegradables, que proporcionan flexibilidad, propiedades mecánicas adecuadas así como de degradación. Lo que se busca ahora es emplear biomateriales compuestos, de tal manera que las propiedades se complementen y se mantengan por más tiempo la morfología y función de las células.

Pruebas para evaluar las interacciones célula-biomaterial

Existen diferentes pruebas para determinar en qué medida se afectan las funciones celulares al interactuar con un biomaterial. El siguiente esquema (Figura 16.4) describe los diferentes tipos de pruebas que se pueden realizar.

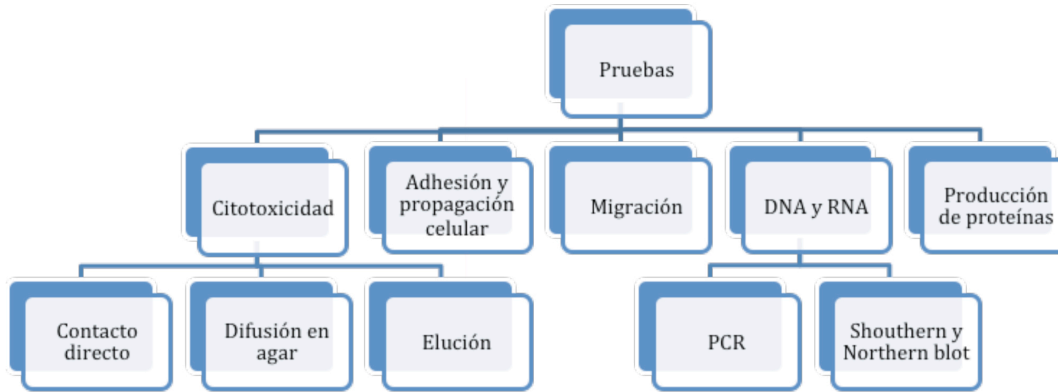


Fig. 16.4 Esquema de las pruebas que se pueden realizar para evaluar las interacciones célula-biomaterial

La citotoxicidad es la capacidad que poseen ciertos compuestos de producir alteraciones de las funciones celulares básicas.

Las pruebas de citotoxicidad son utilizadas para determinar la proporción de células que mueren después de la exposición a un nuevo biomaterial.

La prueba de contacto directo es la más simple. Primero se fabrica el biomaterial de ciertas dimensiones, las células muertas se van de la superficie y flotan en el medio. Se necesita un control negativo y uno positivo para poder estimar el grado de citotoxicidad de la muestra.

Otras pruebas adicionales son:

- Evaluación cualitativa de las células muertas mediante tinción.
- Medición de la cantidad de enzimas como la lactato deshidrogenasa.

En las pruebas de difusión en agar las células se adhieren a la superficie de la placa de cultivo y después son cubiertas por el agar. Los productos solubles de la muestra pueden difundir en el agar y resultar en la muerte celular en las regiones localizadas por debajo del material. La viabilidad de las células se examina después de 1-3 días de exposición.

La prueba de elución se realiza para determinar la citotoxicidad de las moléculas que se encuentran en los biomateriales (como monómeros sin reaccionar o productos de degradación). Las células se colocan en un medio de cultivo en placas con pocillos durante

24 horas. Se prepara el extracto a una temperatura de 37 °C y posteriormente se añade a las placas con los pocillos. La viabilidad es evaluada después de 1-3 días.

La adhesión celular se cuantifica permitiendo que las células se unan a la muestra durante un tiempo determinado y luego se enjuaga quitando las células no adheridas.

La Cámara de Boyden cuantifica el número de células de una población que se mueven fuera de un área determinada.

Las pruebas de ADN y ARN son un tipo de análisis de mutagenicidad del material, usado para determinar o evaluar cómo el ambiente del biomaterial afecta a la expresión génica y por lo tanto a las funciones celulares.

Actividades sugeridas

➤ Investigar sobre un biomaterial, propiedades y características y sus aplicaciones en el área médica.

➤ Leer sobre la generación de andamios para cultivos celulares

➤ Discusión en clase de artículos de divulgación científica:

Serrano López C. Biomateriales: Biología y Química en el diseño de tejidos artificiales.

2011. Disponible en:

http://www.sebbm.es/archivos_tinymce/marzo2011_concepcionherrero.pdf

Lozano D. ¿Se pueden emplear materiales sintéticos para reemplazar un hueso dañado?

2011. Disponible en: http://www.sebbm.es/archivos_tinymce/agosto2011_daniellozano.pdf

Bibliografía

Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials. Pearson Education; 2008.

Lizarbe MA. Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat 101 (1), 227-249; 2007.

Ng R, Zang R, Yang K, Liu N, Yang ST. Three-dimensional fibrous scaffolds with microstructures and nanotextures for tissue engineering. DOI: 10.1039/c2ra21085a.

17. Inflamación y excesos de la inmunidad

Objetivos

- Que el alumno conozca los procesos involucrados en la reparación de un tejido.
- Que el alumno conozca el efecto de implantar un cuerpo extraño en el organismo a través de la respuesta inmune e inflamatoria.

Contenido

Mecanismos de defensa

La respuesta inmunitaria es el conjunto de acciones que emprende el sistema inmunitario ante agentes extraños o patógenos. Aunque la inmunidad es única, sus componentes se suelen asignar a 2 grandes bloques que trabajan en coordinación para mantener nuestra integridad: inmunidad innata o inespecífica e inmunidad adaptativa, específica o adquirida.

La inmunidad innata es rápida pero sin memoria ni mucha especificidad, está mediada por el complemento, los fagocitos, los interferones y los linfocitos NK. El complemento es un grupo de proteínas del suero capaces de unirse a los patógenos y destruirlos. Los interferones son citocinas, pequeñas hormonas inmunológicas sintetizadas por diversas células infectadas para comunicarse con otras células. Los fagocitos son células especializadas en fagocitar patógenos, los principales son los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas. Otra importante función de los fagocitos es la de contribuir a las respuestas adaptativas mediante la presentación de antígenos al linfocito T. Consiste en utilizar los restos ya digeridos del patógeno y exponerlos en membrana sobre unas moléculas especializadas llamadas MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Ese material antigénico es al que responden los linfocitos T.

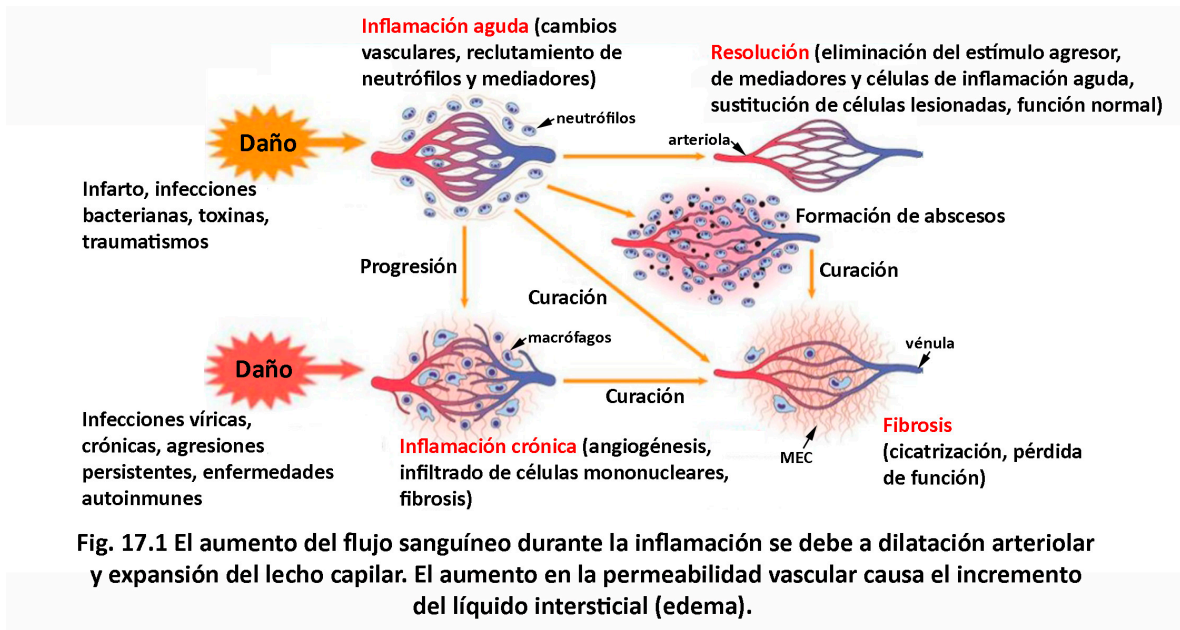
La inmunidad adaptativa está mediada por los linfocitos B y T y por moléculas como los anticuerpos o ciertas citocinas de linfocitos. Los linfocitos B y T utilizan para reconocer patógenos receptores de membrana denominados BCR (*B Cell Receptor*) y TCR (*T Cell*

Receptor), respectivamente. Estos receptores son diferentes entre un linfocito y otro, de manera que para un patógeno concreto sólo uno o algunos linfocitos van a responder (se activarán) y lo recordarán en el futuro (memoria inmunitaria). Para ello, necesitan primero aumentar en número y constituir lo que se llama un clon de linfocitos.

La inflamación mejora la inmunidad

La inflamación es el proceso fisiológico de un organismo por medio del cual el tejido vascularizado responde a un agente irritante o infeccioso. Es un sistema de vigilancia inmunológica que permite detectar agentes extraños o patógenos, y reclutar al sitio moléculas y células inmunológicas a través de la rápida ruta de la sangre. La inflamación puede ser inducida por moléculas del suero como el complemento o por moléculas producidas por células, como los fagocitos o los linfocitos, o por los tejidos dañados que liberan agentes químicos, como resultado directo del traumatismo. La inflamación modifica los capilares que irrigan la zona comprometida aumentando su calibre (vasodilatación), su permeabilidad y su adhesividad. Los tejidos inflamados se enrojecen, se hinchan, se calientan y duelen porque llegan más moléculas y células. Al aumentar el líquido que baña el tejido inflamado, aumenta el flujo del líquido intersticial a los ganglios linfáticos, lo que permite recoger los patógenos y antígenos para su inspección por los linfocitos, que inician así la inmunidad adaptativa. Por último, la inflamación se resuelve con la reparación del tejido afectado, por medio de cicatrización. La inflamación es crucial para mantener la salud e integridad de un organismo, pero cuando el episodio es controlado de modo deficiente, puede resultar en destrucción masiva.

Las respuesta inflamatoria se divide tradicionalmente en aguda y crónica. La aguda es la réplica rápida, de vida corta, relativamente uniforme al daño acentuado, se caracteriza por la acumulación de fluido, proteínas plasmáticas y neutrófilos. Por otra parte, la inflamación crónica se presenta cuando la inflamación aguda persiste; es ocasionada por una eliminación incompleta del foco de inflamación inicial, o como resultado de eventos agudos múltiples que tienen lugar en el mismo sitio. Es de larga duración e incluye la afluencia de linfocitos y macrófagos y crecimiento de fibroblastos y de tejido vascular que favorecen la cicatrización del tejido (Figura 17.1).



Daño tisular

Las células basales derivadas de las células troncales adultas, pueden seguir tres vías diferentes: proliferación, diferenciación o apoptosis. Al recibir un daño tisular se pierde parte de esta población basal, tanto células diferenciadas como MEC; la consecuencia es la activación de mecanismos que permitan recuperar la función y la estructura del tejido.

La reparación tisular varía dependiendo de si el daño es agudo o crónico:

I. Lesiones agudas

- a) Regeneración: restitución total del tejido perdido, por el mismo tipo de tejido, con la misma arquitectura y en ausencia de depósito excesivo de tejido fibroso, bajo las siguientes circunstancias:
 - Daño en células parenquimatosas, como el epitelio
 - Lesión de tejidos quiescentes si se mantiene la matriz, como los hepatocitos
 - Procesos inflamatorios
 - Heridas superficiales
 - Durante el desarrollo embrionario
- b) Cicatrización: intento de regeneración con la aparición de tejido conectivo y la formación de cicatriz, en este caso no se logra una reorganización estructural. Se produce en:

- Daño en células parenquimatosas con lesión grave en la MEC.
- Muerte celular en tejidos con capacidad limitada de regeneración, como el tejido nervioso.
- Heridas profundas con daño en el tejido conectivo importante.

II. Lesiones crónicas

- a) Situaciones inflamatorias crónicas: no se logra restaurar la integridad funcional y persiste la inflamación, como ocurre en las úlceras.
- b) Fibrosis: se produce una respuesta excesiva, es decir una cicatriz exuberante; ocurre en la cirrosis.

Fases de la reparación tisular

La reparación tisular se lleva a cabo en 3 fases, que se ven influenciadas por el microambiente, la extensión del daño y la intensidad y duración del estímulo lesivo, así como por la presencia de infecciones o vascularización inapropiada.

1. Fase inflamatoria o reactiva:

Se producen la hemostasia y la inflamación. La hemostasia es el control de la pérdida de sangre, debido a la vasoconstricción, la activación de la cascada de agregación y activación plaquetaria, participando factores y proteínas; y posteriormente la activación de la cascada de coagulación. En el caso de la inflamación, se aumenta la permeabilidad vascular y se propicia la vasodilatación, de tal manera que se presenta el rubor, tumor, calor y dolor.

El primer paso es la migración de los neutrófilos al foco inflamatorio gracias a factores quimiotácticos, de tal manera que destruyen MEC así como a los gérmenes presentes y su migración cesa cuando la contaminación es controlada, pero si ésta persiste, se retrasa la cicatrización y se prolonga la inflamación, que puede llevar a destruir el tejido normal por necrosis, favoreciendo una infección sistémica.

En la segunda etapa llegan los macrófagos, que liberan diversas citocinas, como IL-1, TNF α , IL-6, LI-8, PDGF y TGF, de tal forma que siguen eliminando contaminantes, promueven la migración y proliferación de células parenquimatosas.

En la tercera fase llegan los linfocitos T que son esenciales para lograr la cicatrización.

2. Fase proliferativa, regenerativa o reparativa:

Se produce angiogénesis, fibroplasia, epitelización y recambio de MEC. La angiogénesis o neovascularización se refiere a la formación de vasos sanguíneos en adultos, depende de la ramificación y crecimiento de vasos cercanos y los factores más importantes implicados en este proceso son: VEGF, angiopoyetinas, TGF- β , IL-8 y ácido láctico. La fibroplasia se refiere a la proliferación de fibroblastos, se produce colágeno, fibronectina y metaloproteínas. Durante la síntesis de MEC, se inicia con una matriz provisional compuesta fundamentalmente de fibrina, fibrinógeno, fibronectina y vitronectina, y posteriormente se deposita colágeno, fibras elásticas y proteoglicanos; por último, la epitelización se produce sobre una lámina basal íntegra o reparada, que actúa como una barrera para evitar la pérdida de líquidos y la entrada de contaminantes, participan: EGF, TGF- α , etc.

3. Fase de maduración o remodelamiento:

Se producen la contracción de la zona lesionada y la remodelación del tejido. La primera se debe a la interacción entre la MEC y los miofibroblastos y el papel de las metaloproteínas que rompen enlaces entre fibroblastos y la MEC quedando el tejido más laxo. En la remodelación del tejido, la matriz laxa e hipervasculada del tejido de granulación es sustituida por un tejido menos vascularizado.

El problema de la reparación de tejido se ha intentado resolver potenciando los procesos de reparación endógenos y con la ingeniería de tejidos, a partir de la implantación de células e implantes de tejido creado *in vitro*.

Los excesos de la inmunidad causan enfermedades

El sistema inmunitario debe protegernos de las infecciones respetando nuestros propios tejidos, pero a veces falla debido a disfunciones. Es el caso de cuando responde a sustancias inocuas, inmunopatía conocida como hipersensibilidad. Además, trastornos en la regulación de la inflamación pueden causar graves enfermedades autoinflamatorias sin causa aparente. Otro ejemplo es cuando ataca los tejidos que se transplantan o transfunden para curar un enfermo. Son las reacciones de rechazo, que va dirigido contra las moléculas MHC. Estas enfermedades son consecuencia de los avances biomédicos que permitieron los trasplantes.

Hipersensibilidad

Existe una gran proporción de individuos que elaboran una respuesta inmune adaptativa frente a sustancias inofensivas para el organismo. Este tipo de respuestas inmunes frente a sustancias extrañas no infecciosas puede producir una patología clínica que se conoce como reacción alérgica o de hipersensibilidad. Las alergias se caracterizan porque generalmente el primer contacto con el alérgeno no origina ningún tipo de reacción. Por ello el primer contacto o fase de sensibilización no produce ningún tipo de manifestación clínica, aunque sí se generan células de memoria y anticuerpos específicos para ese alérgeno, de tal forma que tras una reexposición se producirá la reacción alérgica. Una vez que un individuo está sensibilizado, las reacciones alérgicas pueden agravarse con cada nueva reexposición al alérgeno, ya que va aumentando el número de linfocitos T y B que reaccionan frente a esa sustancia.

Las alergias se agrupan en 4 tipos distintos atendiendo a los componentes del sistema inmune adaptativo que inician la respuesta y a la naturaleza del alérgeno. Las 3 primeras son mediadas por anticuerpos y la cuarta es mediada por células:

Tipo I: Anafiláctico.

También llamada hipersensibilidad inmediata, ocurre después de la combinación de un antígeno con un anticuerpo previamente unido a la superficie de mastocitos, células con abundantes gránulos intracitoplasmáticos llenos de mediadores de inflamación preformados, como la histamina. La reacción empieza con la exposición del individuo a ciertas sustancias que actúan como antígenos que estimulan la producción de IgE por parte de los linfocitos B. Una vez que las IgE se forman, se unen a la superficie de los mastocitos a través de su Fc. Frente a una segunda exposición, los alérgenos se unen a las IgE y se inicia la desgranulación de los mastocitos.

Tipo II: Citotóxico.

En este caso el alérgeno es también una molécula soluble, pero se une a la superficie de las células o de la MEC, donde genera neoantígenos, que son reconocidos por anticuerpos del tipo IgG; los anticuerpos activan el complemento, la fagocitosis y la citólisis celular mediada por anticuerpos, destruyendo las células que llevan unido el alérgeno.

Tipo III: Inmunocomplejos.

Hipersensibilidad mediada por complejos antígeno-anticuerpo que al depositarse, causan reacciones inflamatorias locales, activándose también el complemento y provocando la destrucción de estos complejos por fagocitosis. A diferencia de lo que ocurre en la hipersensibilidad de tipo I, las de tipo II y tipo III generalmente tardan unas cuantas horas en producir síntomas tras la exposición al alérgeno.

Tipo IV: Celular tardía.

Hipersensibilidad originada por la respuesta de células T, tanto frente a antígenos solubles como a antígenos asociados a células. Tarda varios días en producirse, causando daño en los tejidos debido a la secreción de citosinas inflamatorias o a procesos de citólisis. Dentro de este tipo, se distinguen la hipersensibilidad por contacto (como la reacción alérgica a metales como el níquel y el cromo, Figura 17.2), la tuberculínica, la granulomatosa (como en la inhalación crónica de silicio) y la mediada por células T citotóxicas.

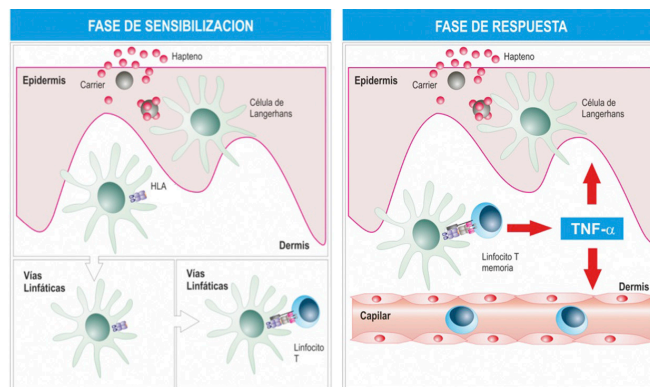


Fig. 17.2 En la hipersensibilidad por contacto, los alérgenos se unen a proteínas para generar neoantígenos, que serán fagocitados por las células de Langerhans (células dendríticas de la piel) que migran a los ganglios linfáticos donde van a sensibilizar a los linfocitos T específicos. Un segundo contacto con el alérgeno inducirá una reacción inflamatoria mediada por linfocitos T y macrófagos en la zona de contacto con el alérgeno. TNF, factor de necrosis tumoral.

Hipersensibilidad a biomateriales

En las reacciones de hipersensibilidad a los biomateriales se cree que liberan metales que difunden muy bien y actúan como haptenos uniéndose a moléculas propias que actúan como portadoras (generando así neoantígenos). Estos complejos son degradados y procesados por células dendríticas, que llevan el antígeno expuesto en moléculas MHC hasta los ganglios, donde se sensibilizan linfocitos T específicos. En cerámicas se han

realizado pocos estudios de hipersensibilidad, mientras en polímeros la evidencia de las respuestas del tipo IV son controvertidas.

La respuesta de un tejido ante un biomaterial genera:

- Reacción inflamatoria inmediata, que puede ser intensa si se induce el rechazo del material implantado.
- Se producen modificaciones hemodinámicas, edema local y varios mediadores pueden incrementar la tensión capilar e hipoxia tisular.
- La zona puede ser invadida por células sanguíneas; la intensidad de llegada de leucocitos y la reacción proteolítica está correlacionada con las propiedades “irritantes” del implante.

Respuesta del tejido a los biomateriales

Una vez se implanta un biomaterial en el organismo se desencadena una reacción inflamatoria inmediata, la cual puede llegar a ser intensa si se produce rechazo del material implantado, en cuyo caso puede ocurrir la extrusión si el implante está en contacto con tejido epitelial (en este caso el material es forzado a salir del organismo).

Al introducir un cuerpo extraño en el organismo, como ocurre con el implante de un biomaterial, se producen modificaciones hemodinámicas, edema local y varios mediadores pueden incrementar la tensión capilar y generar hipoxia (falta de oxigenación) tisular.

Una vez se coloca el implante, los macrófagos y otras células involucradas en el proceso inflamatorio generan señales quimioactivas para promover la migración de fibroblastos y células vasculares al área en cuestión. A los 3 – 5 días, se inicia la formación de tejido de granulación, el cual se genera por la neovascularización o angiogénesis.

En algunos casos, se produce un encapsulamiento fibroso, el cual depende del grado de daño original durante la implantación, la cantidad de muerte celular generada, el lugar de la implantación y el tiempo de degradación del implante.

Si el implante es biodegradable es posible que no se forme una cápsula fibrosa, esto depende de la tasa de degradación, o se forma pero se termina colapsando con el paso del tiempo. En muy pocos casos ocurre la integración, en donde no se forman cápsulas fibrosas ni hay otra respuesta del tejido. Sólo ocurre si hay una aproximación muy estrecha entre el tejido huésped y el implante.

Actividades sugeridas

- Investigar sobre los diferentes tipos de citocinas y su función dentro del sistema inmunitario.
- Realizar lecturas de artículos relacionados con la hipersensibilidad a biomateriales y presentarlos en clase para discusión.

Bibliografía

Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials. Pearson Education; 2008.

Regueiro González JR, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves E. Inmunología: biología y patología del sistema inmune. Médica Panamericana; 2012.

18. Biorreactores para ingeniería de tejidos

Objetivos

- Que el alumno conozca los diferentes tipos de biorreactores utilizados en ingeniería de tejidos y la forma en que puede aumentar la proliferación celular en un ambiente controlado.

Contenido

Generalidades

Cuando un tejido se produce en cultivos estáticos (a pequeña escala), las células más superficiales son más viables y proliferan más que las células crecidas en la zona más interna, dando como resultado tejidos de poco grosor. Esto se debe a la falta de vasos sanguíneos encontrados *in vivo* que entreguen la cantidad necesaria de nutrientes y oxígeno a las células.

Con el fin de superar dichas limitaciones, se han utilizado a los biorreactores para el cultivo de tejidos pues ofrecen diversas ventajas. Los biorreactores son dispositivos donde se llevan a cabo procesos biológicos o bioquímicos en un ambiente de condiciones de operación (pH, temperatura, presión, suministro de nutrientes, etc.) monitoreadas y controladas. La posibilidad de su aplicación a gran escala se debe a su alto nivel de reproducibilidad, control y automatización de los procesos (Figura 18.1). Dentro de estos recipientes (biorreactores) es importante que exista una gran capacidad de transferencia de masa, momento, oxígeno y calor, homogeneidad en las distintas zonas del reactor, factibilidad en la técnica y volumen de operación, y un bajo costo de generación, producción y mantenimiento. Es importante calcular el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_LA) del biorreactor para evaluar la eficiencia en la transferencia de oxígeno, lo cual es crucial para el mantenimiento de células simulando sus condiciones fisiológicas.



Fig. 18.1 Biorreactor industrial

Además, los biorreactores facilitan la proliferación y diferenciación de las células (a través de señales de regulación físicas y bioquímicas), pueden ayudar a superar las limitaciones en términos de viabilidad, y tienen la capacidad de aplicar estímulos mecánicos a las células. Esto puede fomentar la producción de MEC en las células en un menor periodo de tiempo y de forma más homogénea que en un cultivo estático. La importancia de la formación de MEC es, entre otras, incrementar la firmeza mecánica que le provee al tejido.

En el área biomédica y de ingeniería de tejidos, los biorreactores tienen tres funciones principalmente. La proliferación celular a pequeña escala, en la cual se busca obtener una gran cantidad de biomasa sin importar el acomodo. Después de ello se busca la generación de constructos tisulares en 3D, y finalmente se utilizan para el soporte y mantenimiento de órganos completos, brindando estímulos físicos a las células que formarán el tejido.

La estrategia clásica para la producción de tejidos artificiales en biorreactores consiste en aislar células específicas a través de a biopsia de un paciente, crecerlas en andamios biomiméticos en condiciones controladas e implantar el tejido resultante al sitio a regenerar del cuerpo del paciente.

Para poder conseguir un cultivo denso, es importante tener en cuenta el tamaño de poro, y de acuerdo al tipo celular a cultivar será la geometría del soporte. El tipo de biorreactor también depende del tejido a generar.

En el cultivo celular en biorreactores, las condiciones del biorreactor pueden afectar tanto el crecimiento celular como el metabolismo de las células. Los niveles de agitación y aireación del biorreactor pueden generar estrés hidrodinámico que puede dañar las células. La respuesta celular depende de la intensidad y duración de la fuerza aplicada, así como de las características morfológicas y fisiológicas de las células.

Una desventaja de algunos tipos de biorreactores es la distribución heterogénea de las células, ya que pese a que se realice un cultivo homogéneo, después de un largo periodo, la mayor parte de las células se encuentran en la periferia del andamio donde fueron sembradas. Ello se debe a la necrosis y a la quimiostasis de las células. La necrosis ocurre porque en el centro del andamio hay una deficiencia de entrega de nutrientes y remoción de desechos. La quimiostasis se debe al gradiente de concentración de nutrientes. Por lo tanto, para incrementar la viabilidad de las células en el andamio, es necesario incrementar el transporte de fluidos. Dentro de las limitantes en el uso de biorreactores para ingeniería de tejidos y que hay que cuidar a la hora de realizar el diseño de un biorreactor para un tejido en particular se encuentran: la tasa de crecimiento celular, la tasa de insumos, la síntesis de producción y la secreción de productos. Hay que considerar que el consumo de oxígeno varía dependiendo de la célula, del tipo de tejido y de la posición de las células en el constructo generado, ya que las células que no estén nutridas y bien oxigenadas morirán más rápido.

A continuación se presentan los diferentes tipos de biorreactores utilizados en ingeniería de tejidos y sus principales aplicaciones; su uso depende del tipo de tejido que desee desarrollarse.

Matraz estático

Es el tipo más simple de biorreactor, donde el tejido está fijo en un matraz con medio de cultivo. La transferencia de masa ocurre por difusión. Aunque es el método más usado, se han reportado bajas eficiencias de sembrado y distribución celular no uniforme en el andamio.

Matraz agitado

En estos matraces se generan esfuerzos cortantes (fuerza aplicada por unidad de área necesaria para mantener el fluido a una velocidad constante), por ello hay un límite máximo

en la intensidad del mezclado que puede usarse. En un matraz agitado los andamios están suspendidos al extremo de una aguja en un matraz para cultivo. La mezcla del medio se realiza por un agitador magnético y los andamios están fijos. El flujo da como resultado la formación de *eddies*, es decir, inestabilidades turbulentas que dañan las células. Es por estos *eddies* que puede incrementarse el transporte del fluido al centro del andamio. Sin embargo, su mayor desventaja es una insuficiente transferencia de masa y las células residen principalmente en la periferia del andamio.

Biorreactor de paredes rotantes

Está formado comúnmente por dos cilindros donde los microacarreadores o andamios se colocan en un espacio anular entre ambos cilindros. Son sistemas con rotación horizontal equipados con membranas de intercambio de gases por difusión para optimizar el suministro de oxígeno. Los andamios se mueven en el biorreactor gracias a un balance entre la caída libre del andamio debido a la gravedad y las fuerzas centrífugas debidas a la rotación del cilindro externo. La velocidad inicial de rotación se ajusta para que el medio de cultivo y la construcción del tejido roten de forma sincronizada con el biorreactor, lo que permite proveer una transferencia eficiente de nutrientes y desechos. Las paredes rotan a velocidades entre 15 y 30 rpm y proveen una distribución celular más homogénea que en un cultivo estático. La velocidad rotacional se incrementa cuando el tejido crece para asegurar que el andamio permanezca en suspensión.

Biorreactor de fibras huecas

El medio es perfundido a través o alrededor de fibras huecas semipermeables para mantener una alta función metabólica celular al incrementar el transporte de masa tanto de nutrientes como de oxígeno.

Biorreactor de flujo de perfusión

Consiste en hacer fluir el medio de cultivo a través de la construcción andamio-células. Los cultivos en un sistema de perfusión tienen gradientes de concentración mínimos. Este suministro continuo de nutrientes permite alcanzar mayores densidades celulares. Para asegurar que el medio fluya exclusivamente a través de la porosidad del material, algunos diseños de este tipo de biorreactores incluyen el confinamiento del arreglo en cámaras.

En este biorreactor, las células migran hacia el interior del andamio, creando una distribución celular y de la MEC de forma homogénea. Una ventaja adicional es que las

fuerzas hidromecánicas ejercidas por el flujo del medio a través del constructo son benéficas para segregar MEC calcificada para aplicaciones de ingeniería de hueso.

Biorreactor de compresión

Se ha utilizado para la ingeniería de cartílago. Puede ser operado con carga de forma estática o dinámica. Este biorreactor da como resultado la formación de tejido a niveles cercanos a los cartílagos nativos. Consiste de un motor operado a través de una computadora que provee un movimiento linear y un mecanismo de control. Un generador de señal se usa para controlar el sistema y la carga celular, la cual puede transferirse al constructo para el crecimiento celular mediante platinas que distribuyen a la carga de manera uniforme.

Biorreactores de presión hidrostática

Es posible utilizar este biorreactor para aplicar estímulos mecánicos a los constructo. Su objetivo es imitar las condiciones de presión encontradas *in vivo*. Permite que diferentes tipos de constructos se expongan a diversas condiciones de presión fisiológicas. Este tipo de sistema puede facilitar el crecimiento y desarrollo de constructos necesarios para producir injertos vasculares. La cámara puede presurizarse usando un pistón con una membrana impermeable para que el pistón no esté en contacto directo con el medio de cultivo.

Biorreactores combinados

Es posible combinar diferentes tipos de materiales para obtener una mejor simulación *in vitro* del ambiente *in vivo*. En la mayoría de los casos, los biorreactores de este tipo más complicados involucran la adición de un bucle de perfusión en la parte superior de un biorreactor estándar (ya sea hidrostático, de compresión, etc.) con el fin de permitir un mejor intercambio de nutrientes al mismo tiempo que ocurre una estimulación por los diversos estímulos mecánicos.

Aplicaciones de los biorreactores en ingeniería de tejidos

Los biorreactores se han utilizado para la producción de diversos tipos de tejidos operando bajo parámetros distintos según los requerimientos de cada tipo celular. A continuación se describen algunos ejemplos de las características generales del desarrollo de los tejidos

mediante el uso de los biorreactores y la importancia de los estímulos proporcionados por éstos.

Tejido cardiovascular

Como una alternativa a las cirugías *bypass* para el tratamiento de las enfermedades cardíacas coronarias, se ha buscado recrear la estructura de los vasos sanguíneos *in vitro* usando diversas estrategias. Por ejemplo, bajo flujos pulsátiles para producir vasos sanguíneos con propiedades histológicas y mecánicas similares al tejido nativo, o co-cultivos de diferentes tipos celulares donde los andamios pueden cultivarse con células de músculo liso y luego con una capa de células endoteliales cuando el periodo de cultivo esté por terminar.

Los biorreactores empleados están inspirados en la expansión y retroceso de los vasos sanguíneos debido a un incremento y disminución de la presión, respectivamente, dentro del lumen. Se ha logrado un buen desarrollo de cultivo de tejidos vasculares en biorreactores de paredes rotantes y combinado de presión y perfusión.

Cartílago

El cartílago es un tejido no vascularizado que consiste en condrocitos y matriz extracelular. En el organismo, está sujeto a diversos tipos de estrés mecánicos, existe en un ambiente ácido y casi anaeróbico, condiciones que son perjudiciales para su regeneración, es por esto que el cartílago adulto no se regenera eficientemente *in vivo*.

De ahí la importancia de cultivar tejido de cartílago *in vitro*. Cuando las células son sembradas en un sistema con flujo de perfusión, se observa una mejor calidad de la matriz extracelular producida (especialmente cuando se encuentran bajo estrés mecánico) y una mayor densidad celular.

Tejido muscular cardíaco

Cuando se da un infarto al miocardio (ataque al corazón), parte del suplemento de sangre al músculo del corazón se bloquea y los cardiocitos (las células del músculo cardíaco) mueren por la falta de oxígeno. El músculo cardíaco tiene una habilidad limitada para regenerarse y la formación de una cicatriz puede crear más problemas al encoger otros vasos. Por ello, la ingeniería de tejido muscular cardíaco es de gran interés para el desarrollo de un método para la reparación de miocardio. La entrega de oxígeno en células cardíacas es vital para mantener el crecimiento *in vitro* de una capa de tejido suficientemente gruesa.

Para su uso clínico, los injertos ideales de tejido muscular cardiaco deben tener una distribución uniforme y densa de cardiomiocitos, deben contraerse en respuesta a un estímulo eléctrico y una integridad mecánica para una implantación adecuada.

Se ha cultivado tejido cardiaco en cultivo estático pero, dado que el oxígeno disuelto solo se transporta a través de difusión, solo se alcanza un grosor del tejido de 100 μm . Cuando el cultivo se realiza en biorreactores de paredes rotantes se mejora la transferencia de masa pero no se generan estímulos mecánicos típicamente encontrados en un ambiente *in vivo* porque este biorreactor proporciona condiciones de bajo esfuerzo cortante.

Los mejores resultados obtenidos han sido en los sistemas de perfusión pues permiten una mejor y mayor distribución uniforme de células y también pueden observarse contracciones espontáneas de manera sincronizada después de algunos días del sembrado. Es posible que ocurran contracciones espontáneas en el tejido usando matraces agitados y un impulso de propagación debido a un impulso eléctrico, pero solo en la región periférica. Esto representa una desventaja importante porque solo parte del tejido desarrollado muestra la función encontrada en condiciones intracorpóreas. Lo ideal es que la totalidad del tejido artificial tenga las propiedades del miocardio encontradas *in vivo*.

Válvulas cardiacas

El cuerpo humano tiene cuatro válvulas de corazón que mantienen el flujo sanguíneo de una forma unidireccional, del corazón a todo el organismo. Las características generales deseables de una válvula crecida *in vitro* es que cuenten con una geometría estable y con un potencial de crecimiento y regeneración una vez implantadas en el paciente. Ello es importante para los pacientes con malformaciones congénitas de las válvulas que requieren de un reemplazo de larga duración que pueda crecer conforme el paciente lo hace.

Por las razones anteriores, las válvulas creadas por ingeniería tisular pueden ser la mejor opción.

En un cultivo bajo un flujo pulsátil, éste se aplica al andamio mediante el bombeo de aire a una cámara conectado a la cámara del andamio con un diafragma de silicón. La presión a la que el pulso se aplica incrementa con el tiempo. Mientras más fuerte sea el andamio, las fuerzas aplicadas pueden ser incrementadas.

Hueso

El hueso es un tejido altamente vascularizado que se encuentra en constante renovación. Se ha cultivado en matraces estáticos, en biorreactores de paredes rotantes y en matraces agitados. En los matraces estáticos las células se concentran solo en la capa más superficial. En el biorreactor de paredes rotantes se observa una distribución celular más uniforme pero se formó matriz extracelular poco mineralizada. Finalmente, en el matraz agitado se han obtenido resultados satisfactorios, pues los constructos obtenidos mostraron una mayor densidad celular, mineralización y diferenciación. Esto se debe a la sensibilidad de los osteoblastos al esfuerzo cortante causado por el mezclado, lo que activa factores de crecimiento e induce a la formación de fibras de estrés.

Las células cultivadas con estrés mecánico no siempre generan resultados perjudiciales para su desarrollo sino que depende de las necesidades de cada tipo de célula y de las condiciones intracorporales en que se encuentren. Por ello, tiene sentido que la presencia de mayores esfuerzos cortantes sea un factor indispensable en el cultivo de tejido óseo y de cartílago, pues éstos soportan mayor estrés mecánico que otros tejidos en el organismo.

Desarrollo de biorreactores para células hepáticas

Para que la ingeniería de tejidos se convierta en un participante activo de las terapias de reemplazo de órganos, los biorreactores tienen que desarrollarse de tal manera que puedan satisfacer los requerimientos presentados, desde procurar una distribución uniforme de las células, hasta lograr que el proceso sea reproducible y fiable.

Para el cultivo de células hepáticas existen diferentes tipos de biorreactores. Para los dispositivos de hígado bioartificial extracorpóreo (BLA) se utilizan biorreactores de fibra hueca en su mayoría cargados con hepatocitos porcinos y que están inmovilizados. Otro tipo de biorreactor es el de monocapa, andamios perfundidos y suspensiones celulares.

Muchos investigadores han demostrado el beneficio que tiene la siembra dinámica y técnicas de cultivo en un biorreactor de perfusión, que contiene un andamio 3D. Un método de siembra de células simple pero eficaz debe de ser compatible con la química, la morfología (tamaño de poro), la geometría y la configuración del biorreactor. Además, este método debe de ser lo suficientemente suave para permitir una alta viabilidad de las células inmovilizadas y que puedan expresar sus funciones.

Requerimientos básicos en los biorreactores

Los principios generales al desarrollar un biorreactor son los siguientes:

- Selección adecuada del material: los materiales deben ser biocompatibles o bioinertes. Por ejemplo, el acero inoxidable puede utilizarse si es tratado de tal forma que los iones de cromo no se filtren al medio. Otras condiciones que deben cumplirse es que puedan emplearse a 37°C y en un ambiente húmedo y que además las partes del biorreactor puedan ser esterilizadas ya sea por el autoclave o desinfección por sumersión en alcohol. De forma alternativa, pueden usarse partes desechables que sean reemplazadas después de cada uso. Otras opciones en la selección es respecto a su flexibilidad y transparencia u opacidad.
- Monitoreo de las condiciones en el biorreactor: se incorporan sensores para monitorear parámetros como el pH, la temperatura, la concentración de nutrientes o los niveles de oxígeno.
Si se proveen los niveles adecuados en estas condiciones, se podría garantizar una distribución celular homogénea.
- Utilización de bombas: deben ser lo suficientemente pequeñas para caber en una incubadora y ser capaces de aplicar pequeñas fuerzas de forma precisa.
- Para cuantificar la transferencia de oxígeno al medio de cultivo se estima el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_LA), donde “A” considera el área superficial total entre el gas y la fase líquida.
- En el diseño de un reactor es importante considerar el tipo y velocidad de agitación, el esfuerzo cortante, el mezclado, la aireación, la formación de eddies. Todo esto generará un efecto en las células y en su crecimiento.

Para asegurar que se mantenga la esterilidad durante la operación del biorreactor, éste debe diseñarse como un sistema cerrado con la posibilidad del monitoreo. Además, es necesario permitir la automatización del proceso para reducir el error humano.

En la figura 18.2 se ejemplifica el diseño de un biorreactor de perfusión, el cual puede incluir estimulación eléctrica y/o mecánica al constructo.

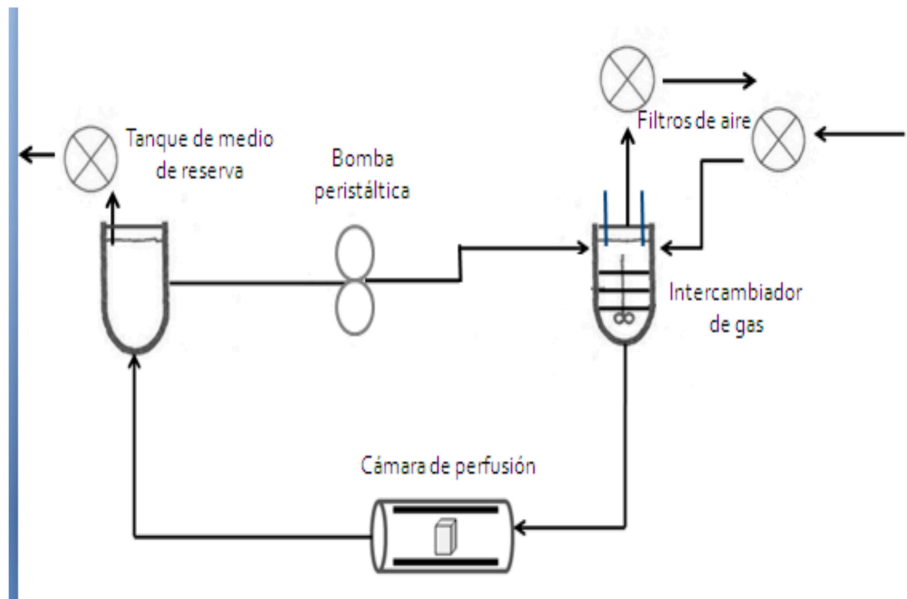


Fig. 18.2 Diseño de biorreactor de perfusión para generación de tejido artificial

Acondicionamiento mecánico

El introducir un estiramiento cíclico para generar un esfuerzo mecánico en el cultivo celular mejora la proliferación y organización de la matriz celular, las propiedades mecánicas del músculo esquelético, y la organización del tejido y expresión de elastina en músculo liso. El esfuerzo mecánico incrementa la actividad biosintética de las células y ayuda en la modulación de la fisiología celular.

No hay mucho conocimiento sobre el esfuerzo mecánico al que deben ser sometidos diferentes tipos celulares para favorecer su funcionalidad, pero se sabe que éste varía de acuerdo a la etapa de desarrollo del tejido en cuestión.

Objetivo final del uso de biorreactores en ingeniería de tejidos

El objetivo de utilizar biorreactores para el cultivo de células y las diversas aplicaciones en ingeniería de tejidos es transferir los modelos de investigación a diseños de manufactura clínicos de forma reproducible, efectiva, económicamente aceptable y siguiendo las buenas prácticas de manufactura (GMP: *good manufacturing practice*), logrando un control de temperatura, pH, oxígeno, número de células, fenotipo, metabolismo y propiedades mecánicas específicas. Hay que evitar el estrés celular al realizar el mezclado y la aireación del sistema, lo cual se puede lograr de una manera más efectiva mediante la inyección de

una corriente gaseosa, que por lo general es aire, la cual se mezcla con el medio de cultivo. En estos biorreactores no hay puntos de disipación de energía y los esfuerzos cortantes son homogéneos por lo que causan poco estrés a las células.

Actividades sugeridas

- Investigar sobre diferentes aplicaciones de biorreactores en ingeniería de tejidos
- Realizar lectura sobre biorreactores en ingeniería de tejidos

Bibliografía

Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends Biotechnol. 22(2): 80-86; 2004

Plunkett N, O'Brien FJ. Bioreactors in tissue engineering. Technol Health Care. 19(1): 55-69; 2011

Chaudhuri J, Al-Rubeai M. Bioreactors for Tissue Engineering. Holanda: Springer; 2005.

Ikada Y. Interface Science and Technology. Tissue Engineering: Fundamentals and Applications. Holanda: Elsevier; 2006.

Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD. Tissue engineering. Estados Unidos: CRC Press; 2007.

Chen J, Lin T. High-density culture of hepatocytes in a packed-bed bioreactor using a fibrous scaffold from plant. Biochemical Engineering Journal. 30: 192-198; 2006.

19. Corazón artificial

Objetivo

- Que el alumno conozca los avances en la generación de tejido cardíaco artificial y de otras aplicaciones de la ingeniería de tejidos en el sistema cardíaco.

Contenido

El sistema cardiovascular es uno de los principales sistemas del cuerpo humano, ya que es el encargado de la distribución de los nutrientes y la eliminación de los desechos en todo el cuerpo; este sistema está formado por el corazón, la sangre y los vasos sanguíneos (venas, vénulas, arterias, arteriolas y capilares).

Las enfermedades del corazón son una de las principales causas de muerte en México y el mundo, a nivel nacional mueren aproximadamente 87 mil personas al año, a nivel mundial 17.5 millones. La insuficiencia cardíaca es una condición que refleja la incapacidad de bombear o expulsar la sangre del corazón adecuadamente, la causa más común de la insuficiencia cardíaca es el infarto al miocardio, el cual está dado por una obstrucción en las arterias coronarias, evitando el paso de la sangre a las paredes del corazón por un tiempo suficiente para que esa parte del corazón sufra daño o muera.

Hay diferentes tratamientos para prevenir la insuficiencia cardíaca, a pesar de esto, el único tratamiento que elimina el tejido dañado es el trasplante de órganos, sin embargo, este tratamiento tiene algunos inconvenientes, entre ellos la baja disponibilidad de órganos y el elevado riesgo de incompatibilidad del órgano con el paciente.

Debido a esto, han surgido nuevas áreas de investigación para el tratamiento de las enfermedades cardíacas, la terapia celular y la ingeniería de tejidos son las nuevas alternativas. La terapia celular consiste en inyectar directamente al tejido cardíaco células troncales adultas para promover la regeneración celular del tejido dañado. Aún no se ha logrado obtener una regeneración total, ni funcional.

Infarto

El infarto al miocardio es la muerte celular del tejido cardíaco causada por falta de aporte sanguíneo a una zona del corazón que es consecuencia de la oclusión en la arteria que se encarga de irrigarlo (Figura 19.1). La oclusión está dada por una trombosis, la cual puede ser consecutiva al desprendimiento de una placa de lipoproteínas en un vaso sanguíneo o por el esfuerzo que el corazón ha presentado para realizar el bombeo de la sangre. El trombo va por el torrente sanguíneo hasta que se produce la obstrucción, suprimiendo el aporte sanguíneo. Si el músculo cardíaco carece de oxígeno durante demasiado tiempo, el tejido de esa zona muere y no se regenera.

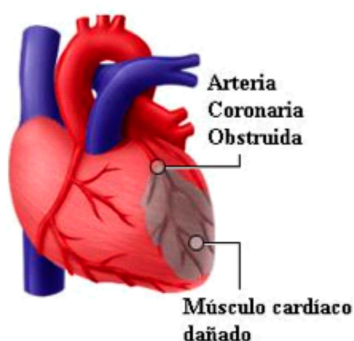


Fig. 19.1 Representación de un infarto al miocardio

Esta enfermedad ocasiona la pérdida de la capacidad de contracción de una parte del corazón, por lo tanto, el flujo sanguíneo disminuye y el esfuerzo del corazón aumenta para poder realizar el bombeo. Si esta enfermedad no se controla, genera la insuficiencia cardíaca, incapacidad del corazón para llenarse o contraerse de forma adecuada; afectando la generación de un gasto cardíaco suficiente para satisfacer las demandas metabólicas del organismo, generando isquemia. En la Figura 19.2 se observan algunas alteraciones del corazón durante la enfermedad.

El tratamiento tradicional de estas patologías consiste en ralentizar y controlar su progreso mediante fármacos, pero no se puede prevenir o revertir el daño posterior del tejido cardíaco ya que se ha comprobado que el corazón tiene una mínima capacidad para regenerarse, 1 % por año a la edad de 25 años, lo cual decrece con la edad; y en caso de insuficiencia cardíaca o cardiopatía severa se requiere un trasplante, lo cual resulta limitado debido a la escasez de donadores.

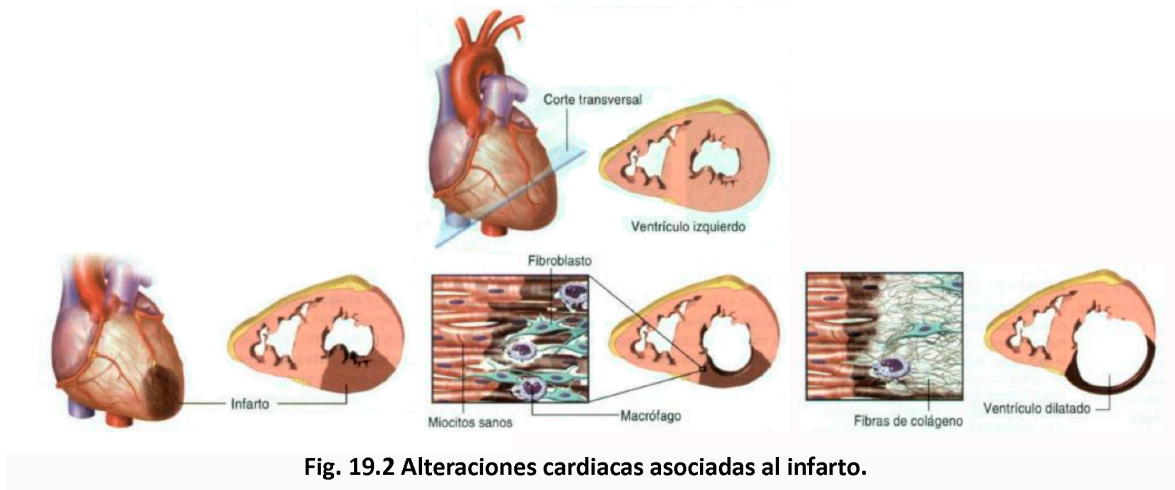


Fig. 19.2 Alteraciones cardíacas asociadas al infarto.

Lo anterior demuestra la necesidad primordial del desarrollo de nuevos y mejores tratamientos que reparen y regeneren el tejido cardíaco. Uno de ellos es la inyección de células troncales directamente al área dañada con el fin de restaurar la función cardíaca del tejido infartado. Esta es una terapia ineficiente, pues se ha comprobado que el 95 % de las células mueren, ya sea en el torrente sanguíneo, por hipoxia o porque no se integran al tejido nativo. Otra opción es la terapia génica con el fin de mejorar el potencial regenerativo, por ejemplo induciendo la reentrada al ciclo celular o mediante la protección de la apoptosis. Tiene como desventajas la formación de tumores y que las células tratadas no desarrollan la fuerza contráctil necesaria.

La regeneración del miocardio inició mediante el cultivo de mioblastos de músculo esquelético ya que son fáciles de obtener, su alta disponibilidad y que son células contráctiles. Se encontró que su beneficio está limitado en zonas de infarto de corazones de roedores y caninos. No se comprobó unión entre cardiomiocitos y mioblastos en regeneración.

El músculo esquelético es el primero utilizado en estudios clínicos. Se logra la generación de mioblastos diferenciados, pero sin acoplamiento electromecánico con el tejido cardíaco adyacente.

Y finalmente otra opción para los pacientes con cardiopatías, es la implantación de tejido cardíaco cultivado *in vitro* mediante la ingeniería de tejidos; que busca restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos u órganos; mediante el trasplante de tejidos cultivados *in vitro* en condiciones controladas que imitan el crecimiento dentro del

organismo. Por lo cual, para la creación de tejido cardíaco se conjuga la selección de una fuente celular, la proliferación de las células *in vitro*, el uso de una estructura de soporte y su correspondiente vascularización.

En el caso específico del corazón, su ensamble requiere utilizar múltiples unidades funcionales que incluyan la función contráctil y excitable del miocardio atrial y ventricular además, de una estructura que constituya al endocardio y epicardio.

Ingeniería tisular

Las unidades funcionales cardíacas creadas mediante la ingeniería de tejidos deben conservar las características nativas de los cardiomiocitos, y adicionalmente, las estructuras sobre las cuales crecen las células deben presentar características especiales:

1. La fuente celular debe ser autóloga o no inmunogénica. Una de las más prometedoras fuentes celulares son las células troncales embrionarias y adultas por su capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular así como propagarse infinitamente. Aunque por otro lado su naturaleza alogénica en el caso de las células embrionarias representa un problema, además las células troncales generalmente forman tumores y existe una baja eficiencia de diferenciación.
2. Los cardiomiocitos se deben integrar y contraer *in vivo*.
3. Resulta esencial que los cardiomiocitos sean sensibles a la isquemia, por lo cual la superficie en donde crecen, debe permitir la difusión sin obstáculos de los nutrientes y del O₂.
4. El tejido implantado debe contar con capilares así como inducir la formación de capilares *in vitro*.
5. El material del andamio no debe inducir una respuesta inmune en el organismo ni liberar productos tóxicos.
6. El cultivo en 3D requiere una estructura con una alta flexibilidad, extensibilidad, estabilidad mecánica y duración, la cual debe permitir la transmisión de cargas así como la propagación del potencial de acción.

Características de las fibras cardíacas:

- Proliferación escasa
- Extremadamente sensibles a la hipoxia.

- Poseen un diámetro de 25 mm y 100 mm de longitud.
- Núcleos grandes y abundantes mitocondrias.
- Los discos intercalares son sitios de adhesión celular.
- Cuentan con depósitos de glucógeno

Características de la MEC cardiaca:

La MEC es una red compleja que rodea y sostiene al tejido conjuntivo y está formada por:

- Fibras elásticas y colágenas
- Proteoglicanos (p. ej., agregano y sindecano)
- Glucoproteínas adhesivas (como fibronectina o laminina)
- Glucosaminoglicanos (por ej., dermatán sulfato, queratán sulfato o ácido hialurónico).

La MEC del corazón contiene aproximadamente 75-90% de colágeno (60-85% Tipo I y 15-40% Tipo III) y 25% de elastina.

Cumple con diversas funciones como son:

- Soporte mecánico y estructural
- Fuerza tensora
- Fija tejidos mediante moléculas de adhesión
- Provee vías para migración
- Fija y retiene factores de crecimiento que modulan la proliferación celular

Aún persisten ciertos problemas en las construcciones de los tejidos desarrollados; pues aún no se tiene claro que fuente celular es la ideal para obtener tejido cardiaco; adicionalmente, las funciones contráctiles y las fuerzas desarrolladas activamente en los tejidos construidos son débiles o no detectables, y al usar andamios la diferenciación de las células no conduce a un fenotipo adulto.

Respecto a la fuente celular, se considera un reto poder aislar cardiomiocitos, ya que están diferenciados y no proliferan en cultivo.

Además, las técnicas para el aislamiento de los cardiomiocitos han sido difíciles de establecer porque estas células están firmemente conectadas una a la otra por discos intercalares y por la matriz extracelular; por lo tanto esas conexiones son difíciles de separar sin dañar a las células.

El éxito de los experimentos de los cardiomiocitos depende de:

- a) Número de células aisladas del corazón.
- b) Su purificación con respecto a otras células cardiacas.
- c) Su habilidad para mantener sus principales características durante un razonable tiempo.

Por lo cual es de relevancia clínica obtener cardiomiocitos de una fuente celular que proporcione las suficientes células que conserven sus características morfológicas y fisiológicas.

Cultivos 2D

Los cultivos 2D o también llamados cultivos en monocapa, permiten establecer rápidamente los efectos biológicos de diversas sustancias sobre las células. Pero entre sus desventajas se encuentran que no hay gran compatibilidad en los resultados obtenidos mediante cultivos 2D y los obtenidos en estudios directamente sobre animales, no pueden reproducir lo que sucede en los cultivos 3D y aún más importante, en los tejidos y tienen menor poder productivo que los cultivos 3D y son más susceptibles a los efectos de fármacos.

Cultivos 3D

Para el cultivo 3D de cardiomiocitos se han utilizado diferentes estrategias:

- a) Cultivar a los cardiomiocitos en matrices prefabricadas (gelatina, alginato, colágeno, ácido glicólico, polietilenglicol, entre otros). Esta estrategia de cultivo tiene como principales ventajas que puede construirse la matriz al menos en teoría, en cualquier forma posible y tamaño, sus propiedades químicas son definidas y se puede controlar la integración y liberación de compuestos bioactivos. Hay sido utilizado con éxito en tejidos como cartílago, hueso, válvulas artificiales, etc. Pero para el cultivo 3D de cardiomiocitos no ha sido exitoso, pues no hay contracción del tejido, hay pobre morfología tisular (no se llega al fenotipo adulto) y existen limitaciones en el tamaño de la matriz pues al aumentar el tamaño de la misma no hay una adecuada difusión de nutrientes, O₂ y CO₂.
- b) Cultivo en matrices solubles (matriz de proteínas, matrigel). Sus principales ventajas son que los cardiomiocitos se diferencian correctamente, la geometría de la

matriz puede alterarse con moldes, y desarrollan una mayor fuerza contráctil comparado con el uso de matrices prefabricadas, pero aún es inferior a la fuerza contráctil que presentan los cardiomiocitos en el corazón, además, otra desventaja que presenta es que la red capilar formada es insuficiente para la construcción y por lo tanto se limita su tamaño.

- c) Apilar monocapas de células cardiacas: sus ventajas son que el tejido desarrollado presenta función contráctil, se pueden apilar diferentes tipos de células y su principal desventaja es que su estabilidad mecánica es mínima.

Biomateriales utilizados en ingeniería de tejido cardiaco

De manera natural ocurre el remodelado post-isquémico. Cuando ocurren procesos isquémicos ocasionan una alteración y con ello se reduce la proporción de colágeno tipo I de 80% a un 40%, mientras que en el colágeno tipo III se reduce de un 10% a un 35%.

Los principales requisitos en los biomateriales para aplicación en ingeniería de tejido cardiaco son:

- Generar la menor respuesta inmune posible
- Ser biocompatibles, biodegradables y no tóxicos
- Favorecer la adhesión celular
- Soportar la rigidez (entre 200-300 KPa) a la cual es sometida el miocardio enfermo
- Tener elasticidad para permitir la contracción y relajación
- Favorecer la anisotropía y la integración eléctrica
- Permitir la vascularización
- Contar con una porosidad mayor al 90%
- Poros homogéneos con un tamaño entre 100 μm -150 μm

Dentro de los biomateriales de origen natural más utilizados para esta aplicación se encuentran:

- Matrices gelatinosas
- Matrices porosas de alginato
- Matrices gelatinosas de alginato y polietilenglicol
- Matrices de colágeno

- Matrices de cola de fibrina

En cuanto a los biomateriales de origen sintético se utilizan:

- Compuestos de ácido poliláctico
- Compuestos gelatinosos derivados del ácido poliláctico y sus isómeros
- Matrices capaces de conducir impulsos eléctricos compuestas de gelatina, alginato, ácido poliláctico y colágeno.
- Matrices de alcohol polivinílico.
- Matrices de poliuretano.
- Matrices de ácido polihidrobutirato poliglicólico.
- Matrices de isómeros de caprolactona láctica

Los tipos de biomateriales más usados son poliméricos (como el PGA) o hidrogeles (como el colágeno y el alginato). La ventaja de los andamios poliméricos es su gran habilidad de proveer soporte mecánico estable al cultivo, lo que promueve la formación de tejido cardíaco, mientras que los hidrogeles brindan un ambiente que estimula la formación de matriz extracelular del músculo cardíaco.

La Tabla 19.1 presenta algunos de los trabajos que se han realizado con diferentes andamios generados a partir de los principales biomateriales utilizados para generar este tejido. En la mayoría de los casos la evaluación se realiza en un periodo corto de tiempo y en general no hay mejoría en la función cardíaca ni generación de vasos sanguíneos.

Existen algunos andamios comerciales como: Tutopatch, hechos de pericardio de bovino y compuestos principalmente de colágeno tipo I. Estos andamios están disponibles en dos formas: discoidales (de diversos diámetros) y rectangular (por ejemplo, de 20 mm de largo y 30 mm de ancho). El grosor de ambos tipos varía de 0.1 a 0.2 mm.

Otro andamio comercial es Optimaix-3D, una esponja de colágeno biodegradable que consiste en colágeno porcino tipo I. También está disponible en forma discoidal (de diversos diámetros) o rectangular, con grosores de 1.5 mm y 3 mm. Las dimensiones más grandes que manejan son de 30 X 40 X 3 mm de grosor o 3.6 cm³.

Andamios valorados	Periodo de evaluación	Células cultivadas y/o tipo modelo en que se implantó	Volumen de eyección	Observaciones	Referencia
Hidrogel de colágeno tipo I y III	6 semanas	Cola de ratón	Aumento	Sin formación de vasos	Jonathan, Leor; Amsalem, Yoram y Cohen Smadar (2005). <i>Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering.</i>
Matrigel	17 minutos	Células madre embrionarias/ ratón	SD	Mayor densidad capilar	Kofidis, T. et al (2005). <i>Novel injectable bioartificial tissue facilitates targeted, less invasive, large-scale tissue restoration on the beating heart after myocardial injury.</i>
Alginato/ calcio reticulado	1, 2, 4, 6 y 8 semanas	Células madre neonatales de rata	SD	Presencia de miofibroblastos en el biomaterial	Boccaccini, aldo y Harding, Sian (2010). <i>Myocardial Tissue Engineering.</i>
Quitosano	1 semana	Ratón	SD	Mejora la función cardiaca en incremento la densidad vascular.	Boccaccini, aldo y Harding, Sian (2010). <i>Myocardial Tissue Engineering.</i>

Tabla 19.1 Biomateriales utilizados para generar andamios en ingeniería de tejido cardiaco. Se muestra el tiempo de evaluación del andamio y los resultados obtenidos para mejorar la función cardiaca.

Caracterización

Las diferentes técnicas de caracterización se realizan con el fin de identificar propiedades morfológicas y funcionales específicas de la línea celular cultivada, además de demostrar la ausencia de contaminación cruzada, confirmar la especie de origen, determinar si es una la línea transformada e indicar si la línea está propensa a variación genética, entre otras.

En el caso de los cardiomiocitos las pruebas realizadas frecuentemente son la inmunotinción, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), ensayos de viabilidad celular y pruebas electrofisiológicas.

Dado que el corazón es uno de los órganos más complicados estructuralmente y funcionalmente, la ingeniería de tejidos se centra en desarrollar partes del órgano, como tejido contráctil o válvulas cardíacas; más que crear órganos completos, por lo cual constituye el mayor reto de la ingeniería de tejidos.

Biorreactores en ingeniería de tejido cardiaco

Para imitar el suministro de oxígeno, que *in vivo* se da por la hemoglobina, el medio de cultivo puede suplementarse con una emulsión de perfluorocarbono (PFC). Comparando este medio con uno no suplementado (medio control), la presión parcial de oxígeno en la

fase acuosa fue menor en un 50%, con un valor de 28 mmHg en el suplementado y 45 mmHg en el control. Estos datos fueron medidos entre la entrada y salida del arreglo.

Los injertos ideales de tejido muscular cardiaco deben tener una distribución uniforme y densa de cardiomiocitos, deben contraerse en respuesta a un estímulo eléctrico y una integridad mecánica para una implantación adecuada.

Se han utilizado andamios de ácido poliglicólico (PGA) para el cultivo de cardiomiocitos en matraces agitados y biorreactores de paredes rotatorias. En ambos sistemas, las células se concentran en su mayoría en la región periférica y en menor medida en la región central.

Es posible que ocurran contracciones espontáneas en el tejido usando matraces agitados y un impulso de propagación debido a un impulso eléctrico, pero solo en la región periférica.

Esto representa una desventaja importante porque solo parte del tejido desarrollado muestra la función encontrada en condiciones intracorporales. Lo ideal es que la totalidad del tejido artificial tenga las propiedades del miocardio encontradas *in vivo*.

Cuando el cultivo se realiza en biorreactores de paredes rotantes se mejora la transferencia de masa pero no se generan estímulos mecánicos típicamente encontrados en un ambiente *in vivo* porque este biorreactor proporciona condiciones de bajo esfuerzo cortante.

Los sistemas de perfusión también permiten una mejor y mayor distribución uniforme de células mostrando contracciones espontáneas de manera sincronizada después de algunos días del sembrado.

Para mantener una concentración adecuada de oxígeno en el medio es necesario conocer la velocidad de consumo de oxígeno de los cardiomiocitos. En la Tabla 19.2 se muestran distintas velocidades de consumo a distintas concentraciones de oxígeno.

Sistema	Concentración de oxígeno en el medio ($\mu\text{mol/L}$)	Velocidad de consumo de oxígeno en $\text{nmol}/(\text{min} \cdot 10^6 \text{ células})$
Perfusión	100	2.2 ± 0.2
Cámara celular cerrada	100	1.5 ± 0.1
Perfusión	220	3.6

Tabla 19.2 Tasa de consumo de oxígeno en diferentes concentraciones de oxígeno disuelto y sistemas. En los 3 casos se usan cardiomiocitos de rata neonatal

Con el fin de evitar en lo posible el daño y muerte celular por las condiciones mecánicas de operación del biorreactor, es indispensable evaluar el esfuerzo cortante al que están sometidas las células. Se ha probado que a partir de un esfuerzo cortante mayor a 2.4 dinas/cm^2 , las células experimentan apoptosis.

Por otra parte, la estimulación eléctrica ha sido empleada para inducir contracciones sincronizadas en constructos cardiacos y mejorar su función en cultivo *in vitro*. Los resultados de algunos trabajos han demostrado que la estimulación eléctrica del constructo debe ser iniciada durante un periodo de tiempo específico del cultivo (después de 3 días de la cultivo). Si la estimulación se aplica antes, se inhibe la acumulación de proteínas cardiacas, dando pobre contractilidad y si se aplica después, la estimulación no tiene efecto en las funciones de las células. Después de periodos extendidos de estimulación eléctrica con ritmos monofásicos, se observa un gradiente de pH, el cual tiene efectos significativos en la función celular. Además, debe tenerse en cuenta que altas corrientes pueden crear subproductos dañinos que afectan el crecimiento celular. En la Figura 19.3 se observa el implante de tejido cardiaco para su validación pre-clínica en un modelo animal.

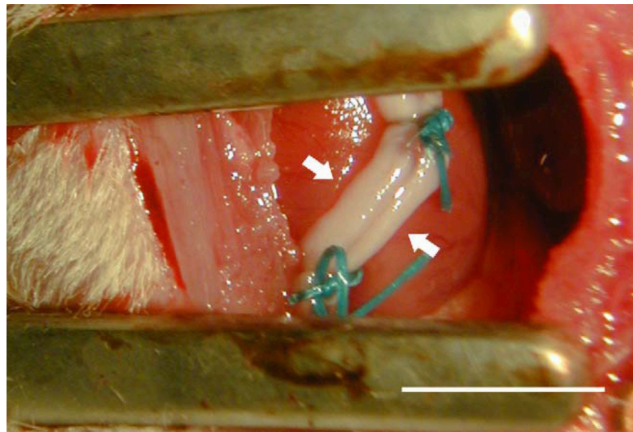


Fig. 19.3 Ejemplo de tejido artificial generado a partir de ingeniería de tejido cardiaco

Actividades sugeridas

➤ Realizar una práctica en laboratorio de disección de corazones de embriones de pollo en donde se apliquen los temas vistos relacionados a cultivo celular y se observen al microscopio los corazones latiendo.

- Realizar una tabla comparativa sobre los tipos de biomateriales utilizados como andamios en cultivos celulares cardiacos, describiendo la metodología utilizada y las pruebas realizadas a los biomateriales *in vitro* e *in vivo*.
- Realizar una visita al laboratorio para observar el cultivo de células cardiacas en biorreactores e identificar los parámetros controlados en el cultivo.

Bibliografía

Hecker L, Birla R. Engineering the heart piece by piece: state of the art in cardiac tissue engineering. *Regenerative Medicine*. 2(2): 125-144; 2007.

Zimmermann W, Didié M, Döker S, Melnychenko I, Naito H, Eschenhagen T, et al. Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovascular Research*. 71(3): 419-429; 2006.

Smith R. Cardiac progenitor cells: *In vitro* and *in vivo* characterization. United States -- Maryland: The Johns Hopkins University; 2008.

Kasper C, van Griensven M, Pörtner R, Scheper T. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*. Alemania: Springer; 2009.

20. Sangre artificial

Objetivo

- Que el alumno conozca los avances en la generación de sangre artificial en México y en el mundo.

Contenido

Generalidades

La sangre es un tipo especializado de tejido conectivo y es el único tejido fluido en el cuerpo, donde las células sanguíneas están suspendidas en un fluido llamado plasma. La sangre es más densa que el agua y aproximadamente 5 veces más viscosa. Es ligeramente alcalina, con un pH de 7.35 a 7.45 y su temperatura es de 38°C, un poco más alta que la temperatura corporal. El volumen en un hombre adulto varía entre los 5 y 6 litros.

Los componentes de la sangre son:

- Eritrocitos: Células rojas que transportan el oxígeno. Representa el 45% de la sangre.
- Leucocitos: También llamadas células blancas cuya función es proteger al cuerpo.
- Plaquetas: Fragmentos celulares que detienen el sangrado. Junto con los leucocitos, componen menos del 1% de la sangre.
- Plasma: Líquido en el que están suspendidas las células. Es el 55% del total de la sangre.

En general, los leucocitos se subdividen en granulocitos, linfocitos y monocitos, pero en la rutina clínica se distinguen 5 tipos de leucocitos:

- Granulocitos neutrófilos
- Granulocitos eosinófilos

- Granulocitos basófilos
- Linfocitos
- Monocitos

La sangre posee las siguientes funciones:

- Transporte.
 - Transporta oxígeno desde los pulmones hacia las células del cuerpo y dióxido de carbono desde las células hacia los pulmones.
 - Lleva nutrientes desde el tracto gastrointestinal hacia las células y hormonas desde las glándulas endocrinas hacia otras células.
 - Transporta calor y productos de desecho metabólico hacia diferentes órganos para que sean eliminados del cuerpo (a los pulmones para la remoción del dióxido de carbono y a los riñones para la eliminación de compuestos de nitrógeno).
- Regulación.
 - Ayuda a mantener la homeostasis de todos los líquidos corporales.
 - Regula el pH mediante el uso de sustancias amortiguadoras.
 - Contribuye en el ajuste de la temperatura corporal a través de las propiedades refrigerantes y de absorción de calor del agua presente en el plasma sanguíneo y su flujo variable a través de la piel, donde el excedente de calor puede perderse y se transferido al medio ambiente.
- Protección.

Contra la pérdida de sangre por medio de la coagulación realizada por plaquetas y proteínas del plasma; y contra las enfermedades por medio de los glóbulos blancos fagocíticos y los anticuerpos).

Formación de células sanguíneas:

La formación de células sanguíneas es conocida como hematopoyesis o hemopoyesis, proceso que ocurre en la médula ósea. Los eritrocitos se originan específicamente en la médula ósea roja, que está compuesta en su mayoría de tejido conectivo que recubre capilares llamados sinusoides sanguíneos. En esta red se encuentran las células inmaduras, macrófagos, células de grasa y células reticulares (aquellas que secretan a las fibras).

Cuando maduran, migran a través de las finas paredes de los sinusoides para entrar al torrente sanguíneo.

Aunque los diversos elementos formados en la médula tienen funciones diferentes, son similares en su origen. Todos surgen del mismo tipo de células troncales, las células troncales hematopoyéticas pluripotentes o hemocitoblastos, que residen en la médula ósea roja. No obstante, sus rutas de maduración difieren, y una vez que la célula se transforma en una línea celular sanguínea, no puede cambiar.

La producción de eritrocitos, la eritropoyesis, comienza cuando una célula troncal mieloide (descendiente de un hemocitoblasto) se transforma en un proeritroblasto, el cual a su vez da origen un eritroblasto previo que produce ribosomas. Se sintetiza la hemoglobina y se acumula el hierro mientras que el eritroblasto final se transforma en un normoblasto. Cuando el normoblasto ha acumulado casi toda su hemoglobina, expulsa la mayoría de sus organelos, su núcleo se degenera y da lugar al reticulocito. Éste, entra al torrente sanguíneo para comenzar con el transporte de oxígeno y se convierte en el eritrocito maduro alrededor de dos días después de su liberación.

El plasma sanguíneo está constituido por un 90% de agua, el resto son 100 diferentes solutos disueltos, como proteínas, iones, nutrientes, hormonas, gases y desperdicios de la actividad celular. Una de las proteínas plasmáticas más importante es la albúmina que, además de actuar como amortiguador en la sangre, transporta moléculas a través de la circulación.

La regulación de la eritropoyesis es trascendental para mantener el balance en el número de eritrocitos en la sangre, ya que un exceso de éstos provoca que la sangre aumente su viscosidad y una escasez conduce al tejido a la hipoxia (privación de oxígeno).

Para asegurar que el número de eritrocitos en la sangre permanezca en el intervalo de homeostasis, el proceso de la eritropoyesis se controla de forma hormonal y depende de un correcto suministro de hierro, aminoácidos y ciertas vitaminas B.

El estímulo directo para la producción de eritrocitos es por la eritropoyetina (EPO), hormona excretada por el hígado pero principalmente por los riñones. Cuando algunas células del riñón se vuelven hipóxicas, aceleran la liberación de eritropoyetina.

Si bien la sangre es un órgano sencillo de sustituir, conlleva algunas dificultades, tales como:

- Efectos adversos a la transfusión de sangre y sus componentes.
- Necesidad de su conservación
- Escasa vida media
- Necesidad de realizar tipificación del grupo sanguíneo

Debido a todo lo anterior, la posibilidad de generar sangre artificial o de tener fuentes alternas de sangre es de suma importancia. Algunos grupos se han enfocado en la obtención de sangre del cordón umbilical para diferentes aplicaciones terapéuticas o la generación de sustitutos artificiales como se describen a continuación.

Sangre del cordón umbilical

La recolección de la sangre del cordón es una oportunidad que se presenta sólo una vez en la vida, al momento del nacimiento del bebé. Estas células genéticamente únicas, actualmente son utilizadas para tratar más de 75 enfermedades, entre las que se encuentran las cardiovasculares, las arteriopatías periféricas, enfermedades neurológicas degenerativas, diabetes mellitus, enfermedades y lesiones óseas y lesiones de la córnea, siendo una alternativa superior a los trasplantes de médula ósea, sin mencionar su futuro potencial en terapia celular para regenerar nuevos vasos sanguíneos y tejido cerebral. La recolección es un procedimiento simple y seguro, sin riesgo alguno para la mamá o el bebé.

Los Bancos de Sangre de Cordón Umbilical empezaron a surgir en México a partir del 2001 y se rigieron por la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2 para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. A partir del 2003 se incluye en el proyecto del NOM los requisitos básicos para el manejo de células troncales que procedían del cordón umbilical, basándose en los estándares internacionales y en la normatividad mexicana. Se iniciaron verificaciones técnicas a los BSCU con el objeto de unificar los criterios de validación de las unidades y sobre todo la seguridad transfusional.

La NOM-003-SSA2 es una norma que tiene por objeto uniformar las actividades, criterios, estrategias y técnicas operativas del sistema nacional de salud, en relación con la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, esta norma oficial mexicana es de observancia obligatoria para todos los establecimientos para la atención médica y, en su caso, para las unidades administrativas de los sectores público, social y privado del país.

Fundación para la Acreditación de Terapia Celular

La Fundación para la Acreditación de Terapia Celular (FACT) fue formada en 1996 por investigadores clínicos y laboratorios activos en el campo de terapia con células progenitoras hematopoyéticas, *hematopoietic progenitor cell (HCP) therapy*, para promover y establecer la calidad de atención al paciente a través de un proceso de acreditación que evalúa los aspectos clínicos y de laboratorio. El progreso continuo en este campo en rápida evolución y los principales avances terapéuticos han hecho que se funden organizaciones importantes en el área: La Sociedad Internacional de Hematoterapia y de ingeniería del injerto (ISHAGE), y la Sociedad americana para trasplante de sangre y médula ósea *American Society for Blood and Marrow Transplantation (ASMBT)*.

El FACT, junto con el Comité Conjunto de Acreditación *Joint Accreditation Committee (JACIE)*, que fue establecido en 1999, adoptó estándares del FACT para así poder regir más países a cargo del JACIE, como Austria, Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Italia, Holanda, Noruega, España, Suecia, Suiza y el Reino Unido para poder llevar a cabo el proceso de recolección de sangre de cordón umbilical para la obtención de células troncales y así, poder realizar terapias celulares.

En México, no existe una ley o legislación en donde indique el uso de células troncales, terapia génica en pacientes para tratamiento a alguna enfermedad, pero en el país, existen dos instituciones que cuentan con banco de sangre de cordón umbilical que se alinean con los estándares de FACT y NetCord, que son el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS) y el Centro Médico La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), siendo el primero el que recibe donación altruista de cordón umbilical para la obtención de células troncales. Estas células se utilizan en el tratamiento de leucemia en niños menores de 8 años.

Avances en investigación

Científicos mexicanos del Centro Médico Nacional Siglo XXI lograron transportar artificialmente por el torrente sanguíneo la molécula de la hemoglobina usando almidón como transportador, que condujo el oxígeno por el sistema cardiovascular, logrando así sustituir los glóbulos rojos de la sangre. Los científicos lograron crear sangre artificial derivada básicamente de dos materiales: La hemoglobina (extraída de los glóbulos rojos de

sangre) y el almidón (producto que puede permanecer sin problemas en las arterias) que procede de la papa y del maíz. La unión de la hemoglobina al almidón, hace que ésta permanezca dentro de las arterias y no se filtre inmediatamente por el riñón debido a su “pequeño tamaño”, por eso la naturaleza la colocó dentro de los glóbulos rojos para evitar que se escape. A falta de éstos los científicos mexicanos descubrieron que la hemoglobina puede ser transportada artificialmente a través del almidón. Después de separar la hemoglobina de los glóbulos rojos fragmentados se mantiene a bajas temperaturas, una vez obtenida se une químicamente a su “transportador” (el almidón) para introducirla a las venas como se hace con una transfusión normal. Mientras que en el proceso de transfusión sanguínea se requiere de una a dos horas para realizar las pruebas necesarias de grupo sanguíneo entre donador y receptor, la sangre artificial, en cambio, al carecer de glóbulos rojos (que son los que llevan en su superficie el grupo sanguíneo) puede infundirse en cualquier momento sin espera de pruebas y se puede aplicar a cualquier tipo de persona.

La transfusión sanguínea es una fuente incierta de infecciones como el SIDA, la hepatitis o la Enfermedad de Chagas, porque no se puede esterilizar. En cambio, la sangre artificial al no tener células puede procesarse a través de diferentes métodos de purificación que le permite estar bajo condiciones estériles. Los científicos mexicanos del IMSS lograron crear sangre artificial, y las pruebas se han hecho sólo en animales de laboratorio. Ahora se está experimentando con perros, puercos y simios. De las transfusiones sanguíneas realizadas en México, el 21% es rechazada por los pacientes que la reciben (1,515,199 personas). El IMSS realiza un 43% de las transfusiones, la SSA un 26%, y los hospitales privados un 12%. Mediante el procesamiento de la sangre, los bancos obtienen cuatro componentes: glóbulos rojos, plaquetas, plasma y crioprecipitados. El análisis de la sangre donada arroja los siguientes resultados: 3% contaminada de VIH, 32% con hepatitis C, 19% con hepatitis B, 4.5% con plomo. Tan sólo el hospital Centro Médico Siglo XXI necesita 250 donadores diarios para las diez operaciones de corazón que se realizan.

Sustitutos artificiales

La sangre es uno de los órganos más fáciles y comunes de sustituir, pues es fluido y se recupera en espacios cortos de tiempo. Existen aún algunas dificultades tanto técnicas como sociales para realizar estos procesos. Entre estas dificultades se encuentra que se pueden

presentar efectos adversos a la transfusión por presencia de distintos antígenos o agentes desconocidos. La sangre se debe de mantener en refrigeración constante y su tiempo de vida media es muy corta, por lo que se han presentado dificultades para tener la disposición de este medio. Se deben realizar varias pruebas de compatibilidad entre los sujetos, como los tipos sanguíneos y la presencia de algunos virus. Existen grupos que se reusan a recibir sangre de otros individuos o de animales transgénicos; por lo cual se han buscado formas de generar sustitutos a las distintas funciones de la sangre dependiendo de las necesidades que se deban de cumplir en los distintos casos y tratamientos.

Para facilitar el estudio se dividen los sustitutos en 3 tipos: Sustitutos de eritrocitos, de plaquetas y de plasma.

Sustitutos de plasma: Se pueden a su vez dividir en tres funciones a cumplir. La de volumen, factores de coagulación e inmunoglobulinas.

Comercialmente se encuentran ya algunos factores de coagulación como factores VIII, IX, VIIa. Y en fases últimas de investigación proteína C, antitripsina, inhibidor de C1 y antitrombina. La mayoría de estos productos se generan en organismos transgénicos o también llamados organismos genéticamente modificados (OGM).

De igual manera, en OGM se generan las inmunoglobulinas y algunas proteínas para volumen como: Antitripsina, factor IX, fibrinógeno, albúmina, antitrombina, anticuerpos monoclonales, factor estimulador de colonias granulocíticas, proteína C, alfa glucosidasa, inhibidor de la C1 esterasa. Dentro de las principales especies animales empleadas son: carneros, cabra, vacas, conejos y cerdos.

De forma sintética, se generan algunos polímeros que modifican la viscosidad de la sangre y que son de acción rápida y de lento metabolismo. Según la Organización Mundial de la Salud los que se deben de utilizar son: Dextrano 70 y la poligelina. Esto para casos de hemorragias y corrección de volumen sanguíneo. Pese a esto, pueden presentar contraindicaciones, sobre todo a nivel renal.

El Dextrano 70 es un polímero de glucosa ramificado. Su origen polisacaroso permite su metabolización a largo plazo, lo que evita acumulaciones graves. La poligelina es un polímero pequeño que debe de ser suministrado con electrolitos, el problema con éste es que aumenta la viscosidad a tal grado que puede generar insuficiencia cardiaca.

Sustitutos de eritrocitos: Otra función primordial a sustituir es el transporte de gases por el torrente sanguíneo, para ello se puede utilizar soluciones de hemoglobina pura, o bien perfluorocarbonos.

La hemoglobina es la proteína encargada dentro de los eritrocitos del transporte de los gases, por lo que su función puede ser realizada de forma independiente, pero esto conlleva a una mayor afinidad por los gases, lo que puede resultar tóxico además de una corta duración en el sistema, de entre 2 a 4 horas antes de ser eliminado. Una medida para contrarrestar esto es introducirlo en liposomas, los cuales disminuyen la afinidad y prolongan su estadía en el torrente sanguíneo por varias horas.

Si bien otra solución son los perfluorocarbonos, los cuales son moléculas de hidrocarburos que están saturados de fluor, éste sustituye los hidrógenos, lo que permite una mayor afinidad por el oxígeno pero no a niveles tóxicos. Otra característica rescatable es que son de pequeño tamaño, lo que permite que llegue a lugares más difíciles como porciones distales del cuerpo o que estén obstruidas, ya sea por hematomas, trombosis o tejido infartado. Algunas de las propiedades físicas más notables de los perfluorocarbonos son:

- Líquidos claros.

- Inodoros.

- Química y biológicamente inertes.

- Alta solubilidad en gas.

- Alta densidad.

- Baja viscosidad.

- Baja tensión superficial.

- Radiopacos.

- Fácilmente esterilizables.

Sustitutos de plaquetas: La mayoría de los productos existentes en mercados son plaquetas liofilizadas o congeladas obtenidas de muestras de sangres “caducas”. Otro de los tratamientos existentes son microesferas de albúminas y lípidos los cuales pueden ser recubiertos con fibrinógeno o similares, los cuales tienen acción de ligación al acumularse.

En general, el estudio de la sangre es una de las grandes metas para la biomédica, pero es también una de las que más desarrollo está presentando a lo largo del tiempo.

Actividades sugeridas

- Realizar una visita al Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea.

Bibliografía

Kühnel W. Atlas Color de Citología e Histología. 11a ed. España: Médica Panamericana; 2005.

Alfonso V. Sustitutos de la sangre. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 17(2); 2001.

Diario Oficial de la Federación 1994 Norma Oficial Mexicana para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. Catálogo de Normas oficiales, Inc.; c1994 disponible en: <http://www.economia-noms.gob.mx/noms/detalleXNormaAction.doc>

García D. Claves para un régimen de la clonación humana. Anuario Mexicano de Derecho Internacional [página de Internet] Instituto de Investigaciones Jurídicas disponible en: <http://biblio.juridicas.unam.mx/estrev/derint/cont/5/art/art5.html>

<http://www.celltherapysociety.org/index.php/about-us/related-organizations/fact>

21. Piel artificial

Objetivos

- Que el alumno conozca cómo está formada la piel y lo que se necesita para generarla artificialmente.
- Conocer los productos comerciales generados.

Contenido

Generalidades

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, protegiéndolo del medio ambiente contra fuerzas mecánicas, factores químicos, radiaciones, cambios de temperatura y microorganismos que pueden generar infecciones. Manifiesta signos y síntomas de enfermedades sistémicas, previene la pérdida de humedad, y protege al cuerpo de rayos ultravioleta. Juega un papel importante en la síntesis de vitamina D, reserva de grasas, eliminación de desechos, equilibrio hidroelectrolítico y secuestro de tóxicos. Además actúa como receptora sensorial del tacto, temperatura, presión y dolor.

La piel es un órgano de vital importancia, estructura compleja y múltiples funciones. Es una “envoltura” con propiedades únicas: compacta, resistente, pero a la vez elástica, sensible y en continuo recambio.

Entre sus funciones se destacan las siguientes:

- 1) Barrera: Mantiene el medio interno, oponiéndose a las pérdidas hidroproteicas.
- 2) Protección: Contra agresiones físicas, químicas y microbiológicas.
- 3) Termorregulación: Conserva el calor por vasoconstricción y por la estructura aislante de la hipodermis; y enfría por vasodilatación y evaporación del sudor.

- 4) Protege de los rayos ultravioletas por medio de 2 barreras: La melánica (fabricada por los melanocitos) y la córnea (queratina) fabricada por los queratinocitos, que impiden que los rayos ultravioletas ejerzan su acción dañina sobre el ADN nuclear.
- 5) Percepción múltiple: A través de la información captada por millares de terminaciones nerviosas distribuidas sobre su superficie.
- 6) Interviene en el metabolismo de importantes moléculas, como la síntesis de vitamina D.
- 7) Vigilancia inmunológica: Por medio de las células de Langerhans.
- 8) Se la podría considerar como un órgano de expresión, por su capacidad de revelar los estados anímicos muy diversos: vergüenza (rubor), ira (enrojecimiento), temor (palidez), ansiedad (sudor), etc.

En resumen, la piel, a través de todas estas funciones asegura el mantenimiento de la integridad y de la homeostasis del organismo.

La piel tiene una superficie aproximada de 2 m^2 , su espesor promedio es de 2 mm, su peso representa el 30% del peso total de un adulto y sus vasos sanguíneos pueden llegar a contener 1800 ml de sangre. Es una estructura bilaminar, formada por la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 21.1).

La epidermis, que se encuentra en la superficie y es la capa más delgada. Carece de vasos sanguíneos. Está compuesta por melanocitos, queratinocitos, y células Merkel que son un tipo de receptor sensorial. Los queratinocitos sintetizan la queratina, la cual actúa como una barrera contra el agua, mientras que las células funcionan como una barrera contra las infecciones. El grosor varía de 0.5 mm (en los párpados) hasta 1.5 mm en las palmas de las manos y en las plantas de los pies.

La dermis, la capa más gruesa e interna de la piel contiene a las glándulas sudoríparas, folículos de vello y vasos sanguíneos. Se comunica con la epidermis mediante la membrana basal. Las proteínas que la conforman son laminina y colágeno IV y VII las cuales son sintetizadas por los fibroblastos. Su grosor es de 0.6 mm en los párpados hasta 3 mm en la espalda, palmas de las manos y en la planta de los pies.

La hipodermis es una capa rica en grasa ubicada debajo de la dermis y la separa de la subyacente fascia muscular.

Alrededor del 97% de la epidermis está compuesta por queratinocitos y, dado que se encuentran en la superficie de la piel, son uno de los tipos celulares más fáciles de obtener. Los fibroblastos, además de secretar los componentes de la matriz extracelular, sintetizan factores de crecimiento que auxilian en el proceso de sanación y de angiogénesis.

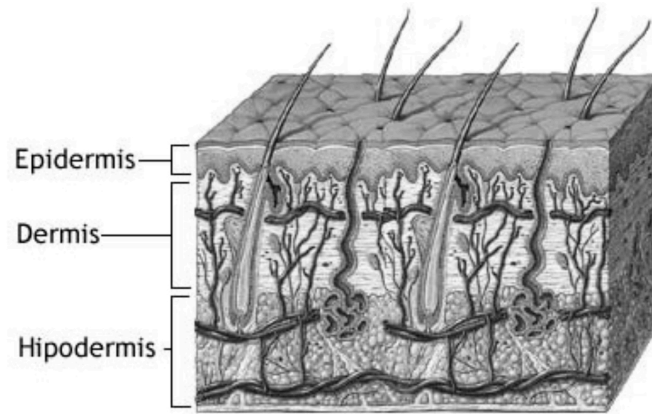


Fig. 21.1 Anatomía de la piel

Cuando la piel ha estado gravemente dañada por enfermedades, accidentes, traumatismos, cirugías extensas o quemaduras, el cuerpo no puede actuar lo suficientemente rápido para fabricar las células de reemplazo necesarias, lo cual ha generado la necesidad de crear un sustituto para la misma.

Inicialmente el cultivo de piel se realizó mediante cultivo celular a partir de explantes celulares. Aun cuando este tipo de técnica no permitía una proliferación epitelial suficiente, se pudo demostrar que los cultivos celulares obtenidos eran válidos y trasplantables a animales. El rápido desarrollo de nuevas técnicas hicieron posible realizar los cultivos a partir de células disgregadas, estableciéndose diversos modelos, pero en líneas generales, las colonias obtenidas por estos métodos no permitían la realización de subcultivos celulares por sobrecrecimiento de los fibroblastos o paradójicamente por ausencia de los mismos.

Ahora analizaremos las quemaduras, que presentan gran incidencia y generan daños graves a la piel, siendo una de las principales causas para generar piel artificial.

Quemaduras

Son una de las heridas físicas más complejas y doloras. El paciente experimenta dolor y además sufre de cicatrices tanto físicas como emocionales. En casos extremos, las heridas por quemaduras abarcan casi la totalidad del área superficial del cuerpo del paciente y podrían llegar a causar la muerte. De acuerdo a la World Health Organization (WHO), las quemaduras representan un grave problema de salud a nivel mundial, registrando 195 mil muertes al año, siendo así la 15^{va} causa de muerte en niños y jóvenes adultos. El 95% de éstas ocurren en países de bajos y medianos recursos y son causadas por diferentes factores, como exposición a sólidos o líquidos calientes, contacto con sustancias químicas, descargas eléctricas, explosiones, entre otros.

Las lesiones por quemadura se clasifican según su profundidad en:

- 1) Primer grado o de espesor parcial superficial: Afecta únicamente la epidermis.
- 2) Segundo grado o de espesor parcial profundo: Daña la epidermis y las capas de la dermis. A su vez, las quemaduras de segundo grado se dividen en superficiales, o profundas, donde se afecta la capa más profunda de la dermis y el folículo piloso se encuentra dañado.
- 3) Tercer grado o de espesor total: Afecta la epidermis, dermis y el tejido subcutáneo.

Tratamientos para daños crónicos de la piel

Los tratamientos para heridas de la piel, tales como úlceras crónicas o quemaduras incluyen autoinjertos, donde se toma el remanente de piel sana del paciente; aloinjertos que consisten en trasplantar la piel de otra persona y colocarla en el paciente; y los xenoinjertos que son sustitutos de piel obtenidos a partir de animales para uso temporal en humanos, siendo la piel porcina la más empleada para el tratamiento de quemaduras.

La opción ideal en recubrimientos en quemaduras son los autoinjertos donde se remueve epidermis y parte de la dermis de un área no afectada y se coloca sobre la herida. Presenta la desventaja de crear dos cicatrices: la de la zona donadora y la injertada. Los pacientes con quemaduras severas no cuentan con la piel sana necesaria para llevar a cabo este procedimiento, además puede requerir múltiples y en consecuencia, costosas intervenciones quirúrgicas. Se han utilizado desde hace casi 40 años los autoinjertos de epidermis cultivada *in vitro* compuesta de una lámina de queratinocitos para cubrir la herida. Su

principal desventaja es el tiempo en realizar el injerto, que varía de 3 a 4 semanas. La desventaja de los xenoinjertos es la necrosis que se genera después de unos días por lo que únicamente sirve como una cubierta temporal hasta que un autoinjerto esté disponible. Adicionalmente, existe el riesgo de rechazo inmunológico, infecciones xenogénicas así como problemas éticos y sociales.

Como una alternativa a las limitaciones de los tratamientos mencionados, la ingeniería de tejidos ofrece la posibilidad de emplear sustitutos de piel diseñados para promover la reparación de la herida de forma temporal o permanente al proveer una barrera ante las infecciones y pérdida de fluidos y promueven la formación de tejido nuevo al optimizar las condiciones para la curación. Adicionalmente, se reduce el número de operaciones durante la aplicación y después de la misma, lo que a su vez disminuye los riesgos médicos, tiempo de recuperación y costos.

Existen numerosos sustitutos de piel comerciales que, pese a su utilidad, aún muestran una tasa de integración mucho menor a la esperada debido a que éstos no presentan adecuadamente las propiedades biológicas y mecánicas del tejido nativo. Por ello, la meta principal es la producción de un sustituto de piel universal de la mejor calidad en el tiempo más corto posible.

Los injertos de piel fueron desarrollados como una manera de tratamiento de quemaduras. El problema en muchas ocasiones reside en que se requiere cubrir una extensa parte del cuerpo, y no siempre se cuenta con la cantidad y calidad suficiente de piel para realizar los injertos.

Ahora hablaremos de las opciones de generación de piel artificial a partir de cultivos celulares y del uso de biorreactores.

Cultivos de piel

Los cultivos de piel *in vitro* (Figura 21.2) se iniciaron a partir de la estandarización de la separación enzimática de la epidermis y la dermis y posteriormente con el cultivo de queratinocitos. Más adelante, se hicieron nuevos procedimientos que permitieron avanzar en este campo. Uno de ellos fue propuesto por Rheinwald y Green, que optimizaron el crecimiento y la expansión de células epidérmicas humanas, utilizando fibroblastos de origen murino que proporcionan principalmente factores de crecimiento a los

queratinocitos. Más adelante, Bell y colaboradores crearon un sustituto dermoepidérmico que fue evaluado en un modelo animal. Esta técnica se transformó posteriormente en el producto Apligraf[®].

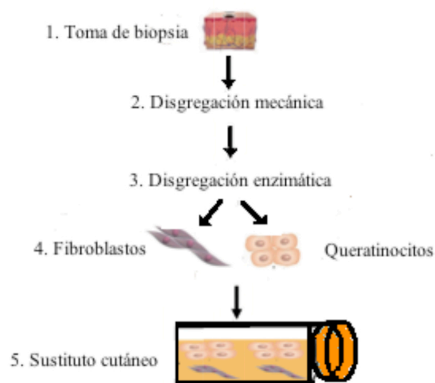


Fig. 21.2 Procedimiento para generar piel

En la misma época se produce Integra[®], el primer equivalente dérmico aceptado y comercializado en Estados Unidos a partir de 1996. La obtención y aplicación de este último producto generó un nuevo campo de investigación con el objetivo de proveer una dermis “sintética” a los pacientes, eliminando la necesidad de autoinjertos. Además, significó un gran avance para la ingeniería de tejidos, al generar una amplia gama de sustitutos y biopolímeros que suministran un soporte mecánico adecuado para la migración y proliferación celulares. Debido a la gran variedad de sustitutos, se han propuesto diferentes clasificaciones (Tabla 21.1).

Estructura anatómica	Tipo de biomaterial	Tiempo del recubrimiento	Fuente del sustituto de piel
Epidérmicos	Biológico autólogo	Largo plazo	Celular
Dérmicos	Biológico alogénico o xenogénico	Mediano plazo	Celular
Dermoepidérmicos	Sintético	Corto plazo	Acelular

Tabla 21.1 Clasificación de los sustitutos de piel

Sustitutos de Piel

Se encuentran disponibles comercialmente diferentes tipos de sustitutos de piel. Los acelulares, como Biobrane[®], Integra[®] y Alloderm[®]. Los celulares alogénicos como TransCyte[®], Dermagraft[®], Apligraf[®] y Orcel[®]. Finalmente, los celulares autólogos como Epicel[®] y Epidex[®], usados como recubrimientos epidérmicos. Todos ellos tienen el propósito de restaurar la función, mejorar la apariencia estética, controlar la pérdida de fluidos, infecciones, contracción y formación de cicatrices.

Asimismo, los sustitutos pueden clasificarse según la capa que constituyen. Los epidérmicos están compuestos por queratinocitos. Un ejemplo es Epicel[®], un sustituto autólogo que sirve como cubierta permanente pero tiene la desventaja de ser muy frágil y carece de resistencia a largo plazo. Los dérmicos, como Dermagraft[®], están constituidos por fibroblastos integrados en una matriz. Finalmente, los sustitutos de bicapa contienen tanto queratinocitos como fibroblastos adheridos a una matriz. Un ejemplo es Apligraf[®], que tiene un grosor de hasta 0.75 mm, pero su uso se limita para el tratamiento de úlceras.

Los sustitutos como Dermagraft[®], cultivado con fibroblastos neonatales, Transcyte[®] y Biobrane[®] únicamente son adecuados para quemaduras superficiales. Además, pese a la extensa variedad de sustitutos de piel disponibles en el mercado, la mayoría es de uso temporal y presentan limitantes importantes al compararse con injertos de piel nativa, como: mayor posibilidad de contaminación microbiana, fragilidad mecánica, mayores tiempos para sanar y costos elevados. Idealmente, los sustitutos de piel deberían estar disponibles cuando se requieran, producir resultados cosméticos aceptables, integración al tejido excelente, ser permanentes, permitir una sanación rápida, no provocar reacción inmunológica y no provocar el riesgo de transmisión de enfermedades. Todo lo anterior no ha sido logrado por ningún sustituto de piel, por lo que su desarrollo sigue siendo un reto. A continuación se detallan algunos de los sustitutos comerciales.

Piel artificial natural

Xenograft[®]: Son xenoinjertos de origen porcino utilizados para cubrir heridas limpias. El Xenograft[®] es usado como un producto reconstituyente que consta de dermis de porcinos homogeneizados, que son moldeados en hojas y redes. Son usados ampliamente para la cobertura temporal de heridas limpias como sitios de quemadura de segundo grado. Su uso

ha sido conocido como favorable en pacientes con necrosis por intoxicación epidérmica y ha sido combinado con plata para evitar la infección de la herida. El Xenograf[®] tiene algunas desventajas, como que no puede obtener alimentación sanguínea dejando en la herida una brecha, siendo esto un transmisor potencial de enfermedades. Por otro lado, los implantes con Xenograf[®] sufren necrosis degenerativa tisular, dado que éste pertenece a diferentes especies, por lo tanto ocurre rechazo del tejido.

Membrana Amniótica Humana: Esta cobertura biológica es abundante en las maternidades y salas de partos y es barata. Se adhiere pobremente a la herida y debe ser cubierta con apósitos oclusivos. Aunque promueve angiogénesis y la densidad capilar, su uso se hace difícil debido a su friabilidad y efectos secundarios como licuefacción y promoción de infecciones por crecimiento bacteriano.

Allograft[®]: Es piel de cadáver humano, aplicada como un injerto de espesor grueso, que se ha utilizado como un método temporal para cerrar heridas.

AlloDerm[®]: Es una matriz proteica formada por alodermis o dermis del donante criopreservada y liofilizada, destruyendo con ello la totalidad de las células. No incluye la capa epidérmica o sustitutoria de la epidermis.

Apligraf[®]: Es proporcionado como un sustituto de piel viviente (bicapa). De la misma manera que piel humana, consta de células vivas y proteínas estructurales.

Piel artificial sintética

Biobrane[®]: Es una fibra sintética bicapa sustituto de la piel, análoga a la epidermis externa, construida de una delgada película de silicona con funciones de barrera comparables a la de la piel, la silicona presenta pequeños poros que permite la eliminación de desechos, permeabilidad para antibióticos de uso tópico.

Transcyte[®]: Está formado por 2 capas, una capa externa que es una lámina de silicona y una capa profunda que es una malla de nylon donde se introducen fibroblastos neonatales. Durante 3 semanas esos fibroblastos van produciendo matriz proteica y factores de crecimiento, entonces se somete el producto a un proceso de criopreservación con lo cual se destruyen los fibroblastos y quedan la matriz proteica, los factores de crecimiento y la lámina de silicona superficial.

Integra[®]: Es una plantilla de regeneración dérmica, la cual consiste en colágena bovina, condroitin-6-fosfato y una membrana de silicona. Este producto es utilizado en heridas o defectos parcialmente profundos. Mientras la dermis del paciente se integra con el colágeno bovino, se va formando nueva piel, y cuando es satisfactoria la regeneración, se retira la capa de silicón. Después una pequeña capa de injerto propio se adhiere a la dermis regenerada.

Omiderm[®]: Es una lámina sintética de poliuretano que permite de forma semipermeable intercambiar con el medio ambiente pero deteniendo el ritmo de evaporación y la penetración de bacterias. A medida que crece el tejido hacia la lámina, el Omiderm[®] aumentará su adherencia, su elasticidad y su transparencia. Permite una aplicación fácil, movimientos completos de las articulaciones y facilidad para inspeccionar las heridas.

Biorreactores en la generación de piel artificial

Se considera que los constructos más adecuados, es decir, aquellos compuestos conformados por células sembradas en un andamio, son los cultivados con células autólogas, pues existe un mínimo riesgo de rechazo inmunológico, sin embargo, la mayor limitante es la dificultad en expandir las células a un número suficiente para su posible aplicación clínica, por lo cual el uso de biorreactores podría ser de gran utilidad para controlar las condiciones ambientales y generar las condiciones fisiológicas necesarias para el desarrollo de la función celular deseada.

No se han reportado muchos trabajos relacionados al cultivo de queratinocitos en biorreactores, sin embargo, Kalyanaraman y colaboradores (2009) produjeron un sustituto de piel compuesto de queratinocitos adheridos a un equivalente dérmico formado por una esponja de colágena-glicosaminoglicano bovino sembrada con fibroblastos. Para ello, cultivaron queratinocitos empleando un biorreactor controlado por computadora conocido como Kerator, compuesto de una cámara de crecimiento, conectado a reservorios de medio a través de mangueras de silicón, una bomba peristáltica multicanal que lleva el medio y las células a la cámara de crecimiento. Los queratinocitos fueron cultivados tanto en el biorreactor como en matraces estáticos a una densidad celular inicial de 4×10^3 células/cm². El equivalente dérmico se elaboró sembrando fibroblastos en la esponja a una densidad de 0.5×10^6 /cm² y después de 24 horas, se adicionaron los queratinocitos

obtenidos del biorreactor y de los matraces para su comparación, obteniendo así el sustituto biológico de piel deseado.

Los fibroblastos de la dermis son de fácil expansión en un cultivo *in vivo*. Sin embargo, las condiciones de los cultivos estáticos dan como resultado una distribución celular heterogénea, donde la mayoría de las células se encuentran en la superficie del andamio. Por su parte, los biorreactores de perfusión, al proveer un flujo uniforme de nutrientes tanto al interior como al exterior de los constructos, permiten obtener distribuciones celulares homogéneas, e incrementar la proliferación celular.

Smith y colaboradores (2004) cultivaron fibroblastos en andamios de colágeno en un biorreactor de perfusión y en condiciones estáticas como control. El sistema de perfusión se mantuvo a 37°C y en una incubadora de CO₂. La oxigenación se llevó a cabo mediante un intercambio gaseoso a través de una manguera de silicón. El medio de cultivo era transportado hacia la cámara con el constructo y devuelto al reservorio del medio con una bomba peristáltica. El flujo utilizado fue de 1 mL/h, equivalente a las condiciones *in vivo* de la dermis. Después de 96 horas de haber sido sembrados los fibroblastos, observaron que aquellos cultivados en el biorreactor alcanzaron una mayor densidad celular que en el cultivo estático.

Pu y colaboradores (2010) cultivaron fibroblastos de la dermis sobre andamios de ácido poliláctico y colágeno empleando un biorreactor de perfusión y un cultivo estático como control por un periodo de 4 semanas.

Observaron que en el biorreactor, las células continuaban proliferando hasta el día 28, mientras que en el cultivo estático éstas alcanzaron su máximo número al día 14. Asimismo, las células cultivadas en el biorreactor migraron de manera homogénea a través del andamio y los poros del constructo se encontraban ocupados por la matriz extracelular excretada, lo que incrementó la integridad mecánica del mismo, a diferencia del cultivo en condiciones estáticas donde la densidad celular fue menor y heterogénea y con una menor cantidad de matriz extracelular.

Sun y colaboradores (2005) emplearon un biorreactor de perfusión para cultivar fibroblastos y queratinocitos tanto en monocultivo como cocultivo. El sistema se mantuvo en una incubadora de CO₂ a 37 °C y estaba compuesto por una cámara de sembrado que contenía al constructo, un reservorio de medio, una bomba peristáltica para el transporte del

medio a través del sistema y un sistema de aireación compuesto por una manguera de silicón para permitir el intercambio gaseoso. Con el biorreactor, realizaron diferentes técnicas de cultivo, en condiciones sumergidas y en interfase aire-líquido, donde determinaron que el monocultivo de fibroblastos mostraba una mayor viabilidad celular en condiciones sumergidas, mientras que el monocultivo de queratinocitos y el cocultivo con fibroblastos y queratinocitos mostraron una mayor viabilidad al ser sembrados en una interfase aire-líquido.

Pese a que los sustitutos biológicos producidos en biorreactores de perfusión presentan claros avances en comparación con los cultivos convencionales en condiciones estáticas, es necesario que se realicen pruebas pre-clínicas de los constructos obtenidos a partir de cocultivos con estimulación mecánica para la evaluación de su integración al tejido nativo y de la regeneración del mismo ante una quemadura.

Actividades sugeridas

- Realizar una tabla comparativa sobre los diferentes productos de piel artificial que hay en el mercado a nivel nacional e internacional.
- Realizar un análisis sobre los diseños de biorreactores generados para la generación de la piel artificial y las pruebas realizadas para evaluar su funcionamiento.
- Realizar lecturas y presentaciones orales sobre avances en generación de piel artificial.

Bibliografía

Arenas Gómez CM, Merizalde Soto GJ, Restrepo Múnera LM. Sustitutos cutáneos desarrollados por ingeniería de tejidos. *Iatreia*. Vol 25 (1):42-53, 2012.

Alcama I. E., *Anatomy and Physiology the Easy Way*. 2a ed. Estados Unidos; Barron's Educational Series: 2004.

Ramos López C, Gan Acosta A, Díaz R. JL. Piel artificial- Vol 2 - *Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada* Número 8 - 2006.

San Román J, Gallardo A, Vázquez B, López Bravo A. *Ingeniería de tejidos: Contribución de los polímeros al desarrollo de los procesos de regeneración tisular*. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC. Juan de la Cierva 3-28006 Madrid, Hospital Provincial de Ávila.

Álvarez Longoria JA, Flores Ochoa M, Hernández García RI, Martínez Menchaca HR, Escamilla Ocañas CE, Rivera Silva G. Una segunda piel: tratamiento con sustitutos dérmicos. Departamento de Ciencias Básicas, Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa, Universidad de Monterrey, Revista Médica MD, Año 4, número 1, 2012.

Kalyanaraman B, Boyce ST. Wound healing on athymic mice with engineered skin substitutes fabricated with keratinocytes harvested from an automated bioreactor. *J Surg Res*, 152, 296-302, 2009.

Smith MJ, Bodamyali T, Stevens C, Howell JA, Horrocks M, Chaudhuri JB. Human fibroblast culture on a crosslinked dermal porcine collagen matrix. *Biochemical Engineering Journal*. 2004;20:217-22.

Pu F, Rhodes NP, Bayon Y, Chen R, Brans G, Benne R, et al. The use of flow perfusion culture and subcutaneous implantation with fibroblast-seeded PLLA-collagen 3D scaffolds for abdominal wall repair. *Biomaterials*, 31, 4330-40, 2010.

Sun T, Norton D, Haycock JW, Ryan AJ, MacNeil S. Development of a closed bioreactor system for culture of tissue-engineered skin at an air-liquid interface. *Tissue Eng*, 11, 1824-31, 2005.

Abreviaturas y símbolos de uso frecuente en este libro

El uso de abreviaturas y acrónimos se ha difundido que sería imposible presentar una lista completa aquí. Por lo tanto, la siguiente lista es incompleta y en cierta forma, arbitraria. Sin embargo, debe servir para que el lector identifique muchos de los términos y símbolos usados.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Célula presentadora de antígeno
C	Centígrados
CSF	Factor estimulante de colonias
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
FDA	Administración de drogas y alimentos
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
g	Gramo(s)
<i>g</i>	Unidad de fuerza de gravedad
GMP	Buenas prácticas de fabricación
h	Hora
HLA	Antígeno leucocitario humano
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a la insulina 1
μ	Micro; 10^{-6}
m	Metro; <i>también</i> mili-, 10^{-3}
M	Molaridad (mol/L); <i>también</i> mega-, 10^6
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad

n	Nano-, 10^{-9}
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poliláctico-poliglicólico
PVC	Policloruro de vinilo
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

Glosario

Ácido desoxirribonucleico: Polímeros compuestos de 4 unidades moleculares diferentes, denominadas desoxirribonucleótidos (abreviados A, G, C y T), que contienen el azúcar desoxirribosa. Los genes son parte de las moléculas de ADN y su codificación viene dada por la secuencia de los desoxirribonucleótidos.

Ácido hialurónico: Constituido por unidades disacáridicas que se repiten, cada una de ellas contiene D-glucosamina o D-galactosamina. Tiene una elevada viscosidad, lo que favorece una hidratación masiva. En el tejido conjuntivo es el principal componente.

Adaptación: Inducción o represión de la síntesis de una macromolécula (generalmente una proteína) en respuesta a un estímulo.

Adhesiones focales: Estructuras adhesivas características de las células en cultivo que se pegan a la superficie de una caja de cultivo. La membrana plasmática en la región de la adhesión focal contiene agrupaciones de integrinas que conectan la matriz extracelular que cubre la caja de cultivo con el sistema de microfilamentos que posee actina del citoesqueleto.

Agar: Obtenido de la pared celular de varias especies de algas, es una mezcla heterogénea de dos clases de polisacáridos: agarpectina y agarosa. Disuelto en agua caliente y enfriado se vuelve gelatinoso.

Albúmina: Proteína globular soluble en agua, muy abundante en el plasma de mamíferos y aves y en los tejidos de reserva, como los huevos de las aves.

Alícuota: Muestra que se toma de un volumen inicial, cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original.

Aloinjerto: Injerto derivado de un donante genéticamente diferente de la misma especie que el receptor.

Amortiguador: Solución que puede interaccionar con el hidrógeno libre o los iones hidroxilo y minimizar el cambio del pH.

Andamio: Estructura hecha de biomaterial natural o sintético, la cual da forma y soporte mecánico para la regeneración de un tejido a partir de células.

Aneuploidía: Dotación cromosómica no múltiplo exacto de la haploide.

Apoptosis: Muerte celular programada que comprende la fragmentación del ADN nuclear.

Aséptico: Libre de infección microbiana

Autócrino: Respuesta mediada por receptor de una célula a un factor producido por la misma célula.

Autoinjerto: Injerto de un individuo trasplantado de nuevo a la misma persona.

Biocompatible: Que no es tóxico ni genera daño y no causa rechazo inmunológico.

Biorreactor: Recipiente de cultivo para la producción a gran escala de células, ancladas a un sustrato o propagadas en suspensión.

Cadherina: Proteína que media la adhesión celular dependiente de calcio.

Cariotipo: Cantidad y características del juego completo de cromosomas de un organismo.

Célula eucariota: Célula caracterizada por una estructura interna basada en organelos como el núcleo.

Célula germinal: Célula que tienen la capacidad de originar gametos, por ejemplo, espermatoocito y oocito.

Célula troncal: Células situada en diferentes tejidos del organismo que constituyen una población de reserva capaz de dar lugar a diferentes células en ese tejido. Son células indiferenciadas, capaces de autorrenovarse (producir células semejantes) y diferenciarse (produciendo 2 o más tipos celulares).

Célula troncal embrionaria: Célula que tiene la capacidad casi ilimitada de diferenciación, lo cual indica un estadio temprano de desarrollo embrionario. Corresponde a los blastocistos de los mamíferos.

Célula somática: Las células del cuerpo, con excepción de las células germinales.

Celulosa: Polímero de glucosa no ramificada con enlaces $\beta(1-4)$ que tienden a agregarse en una formación semejante a cables; sirve como el elemento estructural principal de las paredes celulares de los vegetales.

Cepa celular: Línea celular caracterizada, obtenida por selección o clonación.

Ciclo celular: Secuencia de acontecimientos por los que una célula duplica su dotación cromosómica completa y se divide en 2 células semejantes, con el mismo material genético.

Citoesqueleto: Red estructural de organización interna que presentan las células eucarióticas y que se encuentra implicada en el transporte interno, en la motilidad y en la morfología celular. Consta de 3 tipos diferentes de componentes: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos.

Citosol: Región de contenido líquido del citoplasma fuera de los organelos membranosos.

Clon: Población de organismos, células, virus o moléculas de ADN derivados de la replicación de un único progenitor genético.

Clonación: Procedimiento que permite la obtención de un clon.

Colágena: Familia de glucoproteínas fibrosas conocidas por su gran fuerza de tensión. Constituyen las proteínas más abundante del cuerpo humano, forman parte de la matriz extracelular del tejido conjuntivo y el mineral. Tienen una estructura helicoidal.

Complejo principal de histocompatibilidad: Familia de genes que intervienen en la mediación de las respuestas inmunes de linfocitos T.

Confluencia: Monocapa de células en las que todas ellas están en contacto con otras células de todo su periferia y no hay sustrato disponible sin células.

Constructo: Crecimiento de células sobre un biomaterial que sirve como soporte.

Cromosomas: Estructuras presentes en el núcleo celular, que contienen una doble hélice de ADN lineal muy condensada, asociada a proteínas.

Cultivo celular: Técnica usada para crecer células disociadas fuera del organismo.

Cultivo clonal: Tipo de cultivo primario en el cual relativamente pocas células se agregan a la caja de cultivo, cada una de las cuales, después de colocarse y unirse a la superficie, se aísla de sus células próximas. La proliferación de las células genera colonias individuales, o clonas, de células cuyos miembros derivan de la misma célula original.

Cultivo primario: Cultivo de células obtenido directamente del organismo.

Cultivo en suspensión: Cultivo en el que las células se multiplican suspendidas en un medio de crecimiento.

Diferenciación: Conjunto de procesos por los que las células precursoras adquieren características fenotípicas y funcionales propias y especializadas, y que suele producirse como consecuencia de cambios cualitativos y cuantitativos en la expresión génica.

Difusión: Proceso espontáneo en el que una sustancia se mueve de un área de alta concentración a una de baja, hasta alcanzar la misma concentración en todas las áreas.

Diploide: Hace referencia a una célula o un organismo que contiene 2 juegos completos de cromosomas homólogos.

Densidad celular: Número de células por cm^2 de sustrato.

Desmosomas: Uniones adhesivas con forma de disco que contienen caderinas y se encuentran en varios tejidos, sobre todo los epitelios. Las placas citoplásmicas densas en la superficie interna de las membranas plasmáticas en esta región sirven como sitios de fijación para filamentos intermedios que se extienden hacia el citoplasma.

Endócrino: Factores de señalización, como las hormonas, liberados por un tejido y que tienen un efecto en un tejido distante, al cual llegan a través de la circulación sistémica.

Endotelio: Capa de células parecidas a epitelio que revisten los espacios dentro de los tejidos derivados del mesodermo, como los vasos sanguíneos.

Epitelio: Tejido de revestimiento monoestratificado o pluriestratificado que recubre superficies internas o externas y constituyen las glándulas de secreción endocrinas y exocrinas.

Epítopo: Región de unión de un antígeno con el anticuerpo. También llamado determinante antigénico. La mayoría de los epítomos sobre la superficie de una estructura proteica están formados por 8 a 15 aminoácidos.

Esfuerzo cortante: Fuerza aplicada por unidad de área necesaria para mantener el fluido a una velocidad constante.

Especies reactivas de oxígeno: Sustancias altamente reactivas que contienen oxígeno, como el peróxido, superóxido y radical hidroxilo, formadas en el metabolismo celular aerobio.

Estroma: Parte de un tejido con función puramente de soporte, por ejemplo, tejido conectivo.

Euploidía: Dotación cromosómica múltiplo exacto de la haploide.

Explante: Fragmento de tejido trasplantado de su sitio original y mantenido en un medio artificial.

Factor de crecimiento: Molécula de señalización intercelular, normalmente de naturaleza proteica, que proporciona un estímulo mitógeno a las células diana para impulsar la progresión a través del ciclo celular y la entrada en mitosis. Los factores de crecimiento son

imprescindibles para la proliferación de las células eucarióticas, ya que en su ausencia éstas permanecen quiescentes.

Fase S: Etapa del ciclo celular eucariótico en la cual se produce la síntesis de ADN.

Fenotipo: Características observables de una célula o un organismo que son el resultado de la expresión del genotipo celular.

Fibras de estrés: Estructuras formadas por la activación de la GTPasa RhoA, que constan de filamentos contráctiles de actomiosina, lo que permite la retracción del polo posterior de una célula en movimiento.

Fibroblastos: Tipo celular del tejido conjuntivo que secreta proteínas, como el colágeno.

Fibronectina: Proteína de adhesión de la matriz extracelular. Su función es anclar células al colágeno.

Filamentos intermedios: Fibras fuertes del citoesqueleto de unos 10 nm de diámetro, que según sea el tipo celular, pueden componerse de una variedad de subunidades de proteínas capaces de ensamblarse en tipos similares de filamentos. Proveen estabilidad mecánica y tienen funciones específicas de tejido. Un ejemplo es la citoqueratina.

Flujo laminar: Flujo de un fluido que sigue la forma de una superficie aerodinámica sin turbulencias; dicho de campanas caracterizadas por un flujo estable de aire sobre el área de trabajo con el fin de minimizar la turbulencia y mantener la esterilidad.

Gap junctions: También llamadas uniones comunicantes, son sitios entre las células animales especializados en la comunicación intercelular. Las membranas plasmáticas de las células adyacentes tienen un espacio de unos 3 nm entre sí y las uniones permiten que existan comunicaciones, así como el paso de pequeñas moléculas.

Gelatina: Es un coloide gel (es decir, una mezcla semisólida a temperatura ambiente), incolora, translúcida, quebradiza e insípida, que se obtiene a partir del colágeno procedente del tejido conectivo de animales hervidos con agua. También existe una gelatina vegetal conocida como agar.

Gelfoam[®]: Polvo estéril comercial obtenido a partir de gelatina de piel de cerdo purificada, para aplicación en superficies sangrantes como hemostático. Es insoluble en agua, de color blanquecino, no elástico, poroso y flexible.

Genotipo: composición genética de una célula o un organismo.

Glicólisis: Ruta metabólica de transformación de la glucosa en ácido pirúvico

HEPA: Filtro de aire de alta eficiencia que evitan la propagación de bacterias y virus a través del aire. Los sistemas de filtrado HEPA con fines médicos suelen incorporar luz ultravioleta, llegando a tener una eficiencia del 99.995%.

HEPES: Compuesto amortiguador que se utiliza ampliamente en muchas reacciones bioquímicas y en algunos medios de cultivo celular.

Inhibición por contacto: Inhibición de movilidad celular y de formación de *ruffles* de membrana, cuando las células están en contacto con células adyacentes, como en un cultivo confluyente.

Inmortalización: Adquisición de una capacidad de división celular infinita. Puede ser inducida en líneas celulares finitas por transfección con telomerasa, oncogenes, o por la infección con SV40 o virus de Epstein-Barr. No necesariamente es una transformación maligna, aunque puede ser un componente de ella .

Inmunidad natural: También llamada innata, es aquella de la que dependen las fases más tempranas de la respuesta inmunitaria frente a la enfermedad. Está presente en todo momento y en todos los seres vivos, es inespecífica, no guarda memoria y reconoce componentes microbianos comunes a varios grupos

Inmunidad específica: También llamada adaptativa, es la ejercida por los linfocitos T y B de manera específica de antígeno. Requiere una fase de latencia, mejora con exposiciones sucesivas al antígeno, es muy eficaz, guarda memoria y funciona de manera coordinada con el sistema inmunitario natural.

Integrina: Proteína perteneciente al grupo más importante de moléculas de adhesión. Son heterodímeros $\alpha\beta$, con un dominio extracelular grande, responsable del establecimiento de interacciones específicas, y un único fragmento transmembrana que puede participar en procesos de comunicación intercelular.

In vitro: Literalmente, “en vidrio”. Se utiliza para referirse a que algo está realizándose fuera del huésped, como cultivos de células o de órganos; también se utiliza para indicar reacciones bioquímicas y moleculares llevadas a cabo en un tubo de ensaye.

Laminina: Glicoproteína más abundante de la lámina basal, formada por 3 polipéptidos que se unen entre ellos a través de puentes disulfuro. Su ubicación le permite participar en la unión de las células epiteliales a la lámina basal.

Lamellipodio: Extremo guía de un fibroblasto en movimiento, el cual se extiende como una proyección aplanada y amplia de la célula, que reptará sobre el sustrato.

Línea celular: Clon celular bien definido que puede perpetuarse en cultivo, durante muchas generaciones e incluso, indefinidamente. Se obtiene después del primer subcultivo.

Linfá: Líquido que llena los vasos linfáticos.

Matrigel[®]: Preparación de membrana basal reconstituida que se extrae de una línea celular de sarcoma de ratón, rico en matriz extracelular. Esta constituido de aproximadamente 60% de laminina, 30% de colágeno IV y entactina 8%. También contiene heparán sulfato, metaloproteasas, TGF- β , EGF, IGF, FGF y otros factores de crecimiento.

Matriz extracelular: Macromoléculas secretadas por células en su ambiente inmediato que forman una región de material no celular en el intersticio entre las células. La adhesión y migración celular y la formación de tubos epiteliales dependen de la capacidad de las células para formar uniones a la matriz extracelular.

Mesénquima: Tejido embrionario con capacidad migratoria, que da lugar en el adulto al tejido conectivo, cartílago, músculo, células hematopoyéticas, etc.

Micoplasma: Bacterias de gran interés evolutivo debido a la sencillez de su estructura celular y a su tamaño que oscila entre 0.2 y 2 μm . Están delimitadas solamente por una membrana celular flexible resistente a la lisis osmótica. Carecen de pared celular y gracias a ello pueden pasar fácilmente por filtros bacteriológicos. El nombre micoplasma se deriva de la propiedad de producir formas filamentosas, con aspecto de hongo.

Microfilamentos: Estructuras citoesqueléticas de 8 nm de grosor, compuestas por un polímero de doble hélice de actina. Juegan un papel clave en todos los tipos de contractilidad y motilidad dentro de la célula.

Microtúbulos: Estructuras proteicas cilíndricas de 25 nm de diámetro, cuya pared se compone de tubulina. Debido a su rigidez, actúan a menudo en la capacidad de andamiaje. Contribuyen a formar el citoesqueleto de la célula.

Mitosis: Mecanismo por el cual una célula sufre división nuclear para producir 2 células hijas idénticas con complementos cromosómicos iguales.

Osmolaridad: Concentración de partículas osmóticamente activas en una solución acuosa, expresada en osmoles/L.

Parácrino: Efecto de una célula sobre otra adyacente, mediada por un factor soluble, sin la participación de circulación sistémica.

Parénquima: Parte de un tejido que lleva a cabo la función principal del mismo, por ejemplo, los hepatocitos en el hígado; a diferencia del estroma, que proporciona tejido de soporte.

Pase: Transferencia o subcultivo de células de un recipiente de cultivo a otro; por lo general, implica la subdivisión de una población de células en proliferación, lo que permite la propagación de una línea celular o cepa de células.

pH: Medida estándar de la acidez relativa, que en términos matemáticos es igual a $-\log[H^+]$

Plasma: Fracción líquida y acelular de la sangre. Se obtiene al dejar a la sangre desprovista de eritrocitos y leucocitos. Está compuesto por un 90% de agua, un 7% de proteínas y el 3% restante por grasa, glucosa, vitaminas, hormonas, O₂, CO₂ y nitrógeno, además de productos de desecho del metabolismo. Es el componente mayoritario de la sangre, representando aproximadamente el 55% del volumen sanguíneo total.

Ploidía: Relación de número de cromosomas de un tipo dado de célula a la que se encuentra en las células somáticas normales *in vivo*.

Poli-D-lisina: Poliaminoácido que facilita la unión de las células a superficies sólidas en aplicaciones biológicas, particularmente cuando se cultivan libres de suero. Mejora la interacción electrostática entre los iones cargados negativamente de la membrana celular y los iones cargados positivamente de factores de unión en la superficie de cultivo.

Proteoglicano: Macromolécula multimérica compuesta de una parte mayoritaria glucídica, de glicosaminoglicanos y una parte peptídica minoritaria.

p53: Gen o proteína oncosupresora implicada, entre otras acciones, en la inducción de los mecanismos de reparación del ADN o de la apoptosis.

Radical libre: Especie química muy reactiva que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo.

Ruffles de membrana: Formación de una superficie celular móvil que contiene una malla de filamentos de actina recién polimerizados.

Senescencia: Proceso por el cual las células somáticas normales pierden su capacidad de proliferación, después de un número determinado de divisiones.

Suero: Remanente del plasma sanguíneo una vez consumidos los factores hemostáticos por la coagulación de la sangre. Es de color amarillento traslúcido, transporta los elementos formes y mantiene diferentes sustancias en solución.

Subconfluyente: Menos que confluyente; no todo el sustrato disponible está cubierto.

Sustrato: Matriz o base sólida sobre la cual un cultivo en monocapa crece.

Telomerasa: Enzima con actividad transcriptasa inversa, encargada de la replicación de los telómeros.

Telómero: Extremo de un cromosoma. Cada cromosoma tiene 2 telómeros. Impiden la recombinación con otros cromosomas y son capaces de mantener la capacidad proliferativa de la célula. Se acortan progresivamente en cada división celular, excepto en las células troncales y algunas células tumorales, por la telomerasa.

Tetraploidía: Dotación cromosómica equivalente a 4 dotaciones haploides.

Totipotencia: Capacidad de los oocitos fecundados y de las células resultantes de sus primeras divisiones de dar lugar a todos los tipos celulares especializados y diferenciados presentes en el organismo adulto.

Transformación: Alteración permanente del fenotipo celular, por un cambio genético irreversible. Puede ser espontánea o inducida por acción química o viral. Por lo general produce líneas celulares con mayor tasa de crecimiento, inmortales, con menor requerimiento de suero y una mayor eficiencia de plaqueo.

Tripsina: Endoproteasa de origen pancreático que participa en la digestión de las proteínas a nivel intestinal.

Tritón X-100: Detergente no iónico suave.

Uniones adherentes: Tipo de uniones adhesivas especializadas y comunes del epitelio. Las membranas plasmáticas en esta región están separadas por 20 a 35 nm y son los puntos donde se concentran las moléculas de cadherina. Las células se mantienen juntas por medio de las uniones entre los dominios extracelulares de las moléculas de cadherina y forman puentes en los espacios entre las células contiguas.

Uniones estrechas: Contactos especializados que ocurren en el extremo más apical de los complejos de unión formados entre las células epiteliales adyacentes. Las membranas contiguas hacen contacto en puntos intermitentes, donde las proteínas integrales de las 2 membranas adyacentes están muy próximas.

Vía de transducción de señales: Pasos en los que interviene una serie de distintas proteínas, a través de los cuales se transmite la información desde el punto de estimulación en la superficie de la célula hasta su interior.