

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

DIVISION DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERIA



TECNOLÓGICO
DE MONTERREY

PATRONES DE COLONIZACION DE CELULAS
ENDOTELIALES Y CELULAS MADRE
EN DISCOS ROTATORIOS.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

POR:

MARIA JOSE RIVAS ARREOLA

MONTERREY, N. L.

AGOSTO 2005

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY**

CAMPUS MONTERREY

**DIVISION DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERIA**



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY**

**PATRONES DE COLONIZACION DE CELULAS
ENDOTELIALES Y CELULAS MADRE
EN DISCOS ROTATORIOS.**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

POR:

MARIA JOSE RIVAS ARREOLA

MONTERREY, N. L.

AGOSTO 2005


INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
MONTERREY
CAMPUS MONTERREY


DIVISIÓN DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA


Los miembros del comité de tesis recomendamos que el presente proyecto de tesis presentado por la I. Q. María José Rivas Arreola sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado académico de:

Maestro en Ciencias
Especialidad en Biotecnología

Comité de tesis:

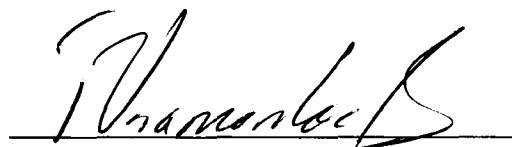

Mario Moisés Álvarez, Ph. D
Asesor


Dra. Ma. Teresa González
Sinodal


Dra. Ma. Teresa Collados
Sinodal


Lucio Florez, Ph. D
Sinodal

Aprobado


Federico Viramontes Brown, Ph. D.
Director del Programa de Graduados en Ingeniería

Monterrey, N. L.

Agosto 2005

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme fuerzas cuando me desesperé, por darme sabiduría y por iluminar mi vida cuando se ha obscurecido.

A mi asesor, Dr. Mario M. Álvarez, por todo lo que me ha enseñado, por confiar en mí y por recordarme que los límites los pone uno mismo.

A Myriam Robledo por ser la cara amable del Centro de Biotecnología, por TODO lo que hizo por mi desde la primera vez que hable con ella.

A la Dra. L. Palomares por ser la primer persona que me enseñó a trabajar con las células de mamífero y darme sus secretos; por su paciencia y su apoyo.

A la Dra. M. Collados y la Dra. T. González por permitirme aprender de ellas, por sus recomendaciones y observaciones siempre tan acertadas.

A Raúl, Roció y Paulina, por ser mis amigos incondicionales, por darme su apoyo, por no olvidarme y por estar conmigo a pesar de la distancia.

A Rosario y Adriana por estar conmigo y ser parte de esta etapa a pesar de que nuestras vidas son ahora muy distintas.

A Esperanza... por estar conmigo una y otra vez.

A Gloria Serrano, por ser mi apoyo, mi consuelo, mi amiga y la persona que nunca permite que mi fe se debilite.

A mi tía Ali y la miss Alex, por estar al pendiente de mi... gracias por TODO!!!

A todas las personas que he conocido en estos dos años: Esther, Guadalupe, Yajaira, Verónica, Citlali, Jorge, Alex, Janeth, Irasema, Ana, Yadira, Gabriela, Marisol.

A Mariana Barberena... por todos los cafés, por las conversaciones interminables, por su apoyo incondicional, por dejarme ser parte de su familia, por enseñarme un mundo tan maravilloso como lo es su historia. Porque tu amistad me permitió que abriera mi corazón cuando este no quería saber de nada...

A todos mis familiares y amigos que no puedo mencionar por falta de espacio, pero todos ustedes son parte de mis logros.

Índice de figuras

Figura 3.1	Diagrama la incubadora de discos rotarios, la incubadora tiene 2 puertas, una de protección (que posee en tablero de control de temperatura y velocidad) y una de cristal que permite la visibilidad al interior.	17
Figura 3.2	Caja Petri de vidrio (D= 14 cm.) con tres diseños de grabado lineales (horizontal, vertical y diagonal) y una porción lisa; las flechas blancas indican el sentido del flujo rotacional impuesto.	17
Figura 3.3	Caja Petri de vidrio con grabado de círculos concéntricos.	18
Figura 3.4	Diagrama de flujo experimental.	19
Figura 3.5	Diagrama de microplaca de 24 pozos. (a) Vista superior de la microplaca. (b) Vista lateral de un pozo de la microplaca.	24
Figura 4.1	Esquema de la adhesión celular de células madre en la orilla hacia el centro de la caja de Petri.	27
Figura 4.2	Cultivo de células madre en cajas Petri de vidrio (D= 10 cm.) en cajas estáticas y sin patrones de grabado. (a), (b) y (c) ilustran células madre a diferentes puntos de los extremos de las cajas de cultivo.	28
Figura 4.3	Registros fotográficos de células madre a 0 RPM cultivadas en cajas de vidrio (D= 14 cm.) con 3 patrones de grabados gruesos. (a) centro de la caja Petri; (b) en los extremos de la caja y (c) entre las líneas de grabado, cerca de los límites de la caja. La observación es después de 168 hrs. de cultivo.	29
Figura 4.4	Registros fotográficos de células madre a 0 RPM cultivadas en cajas Petri de vidrio (D= 14 cm.) con tres patrones de grabado fino. (a) el centro de la caja; (b) en los extremos de la caja en la parte sin grabado; (c) entre las líneas del grabado, cerca de los límites de la caja.	30
Figura 4.5	Registros fotográficos de células madre teñidas con propidium®, cultivadas a 3 RPM en cajas Petri de vidrio (D= 14 cm.) con tres distintos grabados gruesos. (a) patrón de grabado vertical; (b) sin patrón de grabado; (c) patrón de grabado horizontal y (d) patrón de grabado diagonal (45°).	31
Figura 4.6	Registros fotográficos de células madre teñidas con propidium® y cultivadas a 3 RPM en cajas Petri de vidrio (D= 14cm.) con tres patrones de cultivo fino. (a) patrón de grabado vertical, (b) sin patrón de grabado, (c) patrón de grabado horizontal y (d) patrón de grabado diagonal (45°).	32

Figura 4.7	Registros fotográficos de células madre teñidas con propidium® y cultivadas en cajas Petri de vidrio (D= 14 cm.) con tres tipos de grabado grueso a 5 RPM. (a) patrón de grabado horizontal, (b) sin patrón de grabado, (c) patrón de grabado vertical y (d) patrón de grabado diagonal (45°).	34
Figura 4.8	Registros fotográficos de células madre cuyos núcleos fueron teñidos con propidium® y cultivadas en cajas Petri de vidrio (D= 14 cm.) con tres tipos de grabados finos. (a) patrón de grabado horizontal, (b) sin patrón de grabado, (c) patrón de grabado vertical y (d) patrón de grabado diagonal (45°).	35
Figura 4.9	Registros fotográficos de células HUVEC teñidas con propidium® y cultivadas a 3 RPM en cajas Petri de vidrio (D= 14 cm.) con círculos concéntricos como patrón de grabado, de grosor fino.	38
Figura 4.10	Condensado de curvas de crecimiento (0, 3, 5 y 8 RPM).	40
Figura 4.11	Curva de crecimiento a 8 RPM.	41
Figura 4.12	Curvas de regresión para determinar la velocidad específica de crecimiento (μ) a diferentes velocidades (0, 3 y 5 RPM) ajustando a una recta.	43

Índice

Índice de figuras	i
Índice de tablas	iii
Lista de abreviaturas	iv
RESUMEN	1
Capítulo I. INTRODUCCION	3
1.1 Contexto de la presente investigación	3
1.2 Justificación, originalidad e impacto de la investigación	4
1.3 Objetivo general	5
1.4 Objetivos específicos	5
Capítulo II. ANTECEDENTES	7
2.1 Condiciones críticas de crecimiento de células de mamífero	7
2.2 Técnicas de cultivo celular	9
2.3 Superficies para crecimiento celular	9
2.4 Células utilizadas en la presente investigación	10
2.4.1 Células madre	10
2.4.2 Células endoteliales de vena de cordón humano (HUVEC)	11
2.5 Contribuciones relevantes reportadas en literatura sobre patrones de crecimiento y asociación de células de mamífero	12
Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Diseño de equipo	16
3.1.1 Diseño de incubadora	16
3.1.2 Diseño de las placas de cultivo	16
3.2 Matriz de condiciones para los experimentos con discos rotatorios	18

3.3	Obtención de células	20
3.3.1	Aislamiento de células madre	20
3.3.2	Aislamiento de células HUVEC	20
3.4	Técnicas de cultivo y preservación	21
3.4.1	Cultivo de células (madre y HUVEC)	21
3.4.2	Resiembra de células (madre y HUVEC)	22
3.4.3	Criopreservación de células	23
3.5	Técnicas de análisis	23
3.5.1	Tinción de núcleos de células	23
3.5.2	Curvas de crecimiento	24
Capítulo IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1	Visualización del crecimiento celular en cajas estáticas y sin patrones de grabado	26
4.1.1	Células madre cultivadas a 0 RPM y sobre superficies sin grabado	26
4.2	Características del crecimiento celular en superficies con patrones de grabado	28
4.2.1	Células madre cultivadas a 0 RPM, en superficies con grabado grueso	28
4.2.2	Células madre cultivadas a 0 RPM, en superficies con grabado fino	29
4.2.3	Células madre cultivadas a 3 RPM, en superficies con grabado grueso	30
4.2.4	Células madre cultivadas a 3 RPM, en superficies con grabado fino	32
4.2.5	Células madre cultivadas a 5 RPM, en superficies con grabado grueso	33
4.2.6	Células madre cultivadas a 5 RPM, en superficies con grabado fino	34
4.2.7	Células madre cultivadas a 8 RPM	36
4.2.8	Comparación de condiciones estudiadas	36

4.2.9	Células HUVEC cultivadas en cajas con superficies grabadas con patrones circulares concéntricos.	37
4.2	Evaluación de curvas de crecimiento y parámetros cinéticos	39
4.2.1	Curvas de crecimiento	39
4.2.2	Estimación de tiempos de doblaje	41
4.2.3	Tasas específicas de crecimiento	43
Capítulo V.	Conclusiones	45
Capítulo VI	Bibliografía	47

RESUMEN

La ingeniería de tejidos es actualmente una de las áreas de mayor interés dentro de las disciplinas biomédicas. Para esta aplicación, es necesario “aprender” a controlar la forma en que las células individuales se asocian y crecen para formar tejidos útiles para trasplante.

El presente trabajo tuvo como objetivo la descripción, comparación y análisis de patrones de colonización y crecimiento de líneas celulares [células madre y células de endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC)] cultivadas en discos rotatorios a diferentes velocidades y con diferentes texturas de grabado. Se hipotetiza que la imposición de un campo de velocidad rotatorio puede favorecer la formación homogénea de monocapas celulares y acelerar el proceso de formación de tejidos.

Se extrajeron células madre de fémur de rata, y se aislaron con gradiente de densidad con Percoll® y células endoteliales de cordón umbilical de humano, según la técnica de Gimbrone y colaboradores (1974). Las células madre se cultivaron en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) y las endoteliales en medio 199 durante 168 hrs., a 37° C, con 5 % de CO₂, en cajas petri de vidrio (D =14 cm.) grabadas con diferentes patrones (grabado sobre vidrio) y sometidas a diferentes velocidades (0, 3, 5 y 8 RPM). Transcurrido el tiempo de cultivo los núcleos de las células fueron tenidas con Propidium® (colorante fluorescente) y se tomaron registros fotográficos de sus patrones de colonización. Adicionalmente, se evaluaron las curvas de crecimiento correspondientes a distintas velocidades de rotación, en microplacas de 24 pozos de acuerdo con protocolos estándar de conteo de células de mamífero (Freshney, 2000). Se reportan tiempos de doblaje a distintas condiciones de rotación.

La imposición de un campo rotacional y diferentes grabados, tiene efecto en los patrones de crecimiento y la velocidad de crecimiento observado en los cultivos celulares. Se observa preferencia de colonización en los bordes de los grabados. En discos en rotación, la colonización de las superficies de cultivo es más homogénea que en cajas estáticas (0 RPM). La velocidad de crecimiento celular a 3RPM y 5RPM es

superior a la observada en sistemas estáticos. En cajas rotando a 8 RPM, la adhesión celular fue deficiente. Nuestros resultados evidencian la existencia de una condición óptima de rotación de los discos, que favorece la velocidad de crecimiento celular, y la existencia de un umbral de velocidad máxima, después del cual la colonización no es apropiada.

Los resultados demuestran que tanto la textura grabada, como la imposición de un campo de velocidad rotacional, tienen efecto en los patrones de colonización y crecimiento de células madre y endoteliales en cultivo. Los cultivos sujetos a flujos rotacionales moderados (3 y 5 RPM) aceleraron su ritmo de crecimiento celular y colonizaron superficies de forma más homogénea.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En esta sección, se documentan los protocolos utilizados para ejecutar el presente trabajo de investigación. Células madre y células endoteliales humanas, fueron sometidas a cultivo por 168 horas, sobre placas de Petri grabadas en su fondo con diferentes patrones. Las células fueron incubadas en una atmósfera de CO₂ especialmente diseñada para el propósito, bajo condiciones de rotación a 0, 3, 5 y 8 RPM. Paralelamente, se evaluó el efecto de distintas velocidades rotacionales sobre las curvas de crecimiento de células madre cultivadas en microplacas de 24 pozos. La sección 3.1 documenta detalles del equipo (incubadora con plataformas giratorias) y del diseño de las cajas Petri utilizadas para los experimentos. La sección 3.2 presenta, en forma general, la matriz de experimentos realizados. La sección 3.3 detalla los procedimientos relacionados con la mantenimiento, criopreservación, y cultivo de las líneas celulares utilizadas. La sección 3.4 detalla los experimentos realizados para evaluar curvas de crecimiento a distintas velocidades de rotación en microplacas de 24 pozos.

3.1. DISEÑO DE EQUIPO

3.1.1. Diseño de incubadora

Para llevar a cabo esta investigación se diseñó una incubadora prototipo (ver figura 3.1). Este diseño consta de una estructura giratoria (que se acopla externamente a un motor), que permite rotar hasta 5 plataformas circulares a una velocidad determinada en el rango de 0-8 RPM. Dicho equipo permitió el cultivo de células de mamífero controlando la concentración de CO₂, humedad y temperatura.

3.1.2. Diseño de las placas de cultivo

Cajas petri de vidrio con un diámetro de 14 cm. fueron grabadas con la técnica de sand blast con patrones de dos grosores diferentes (grueso: línea de 3mm, espacio entre líneas de: 1mm; fino: línea de: 1mm, espacio entre líneas de: 0.5 mm)). Las orientaciones de grabados ensayados en esta investigación se ilustran en las figuras 3.2 y 3.3.

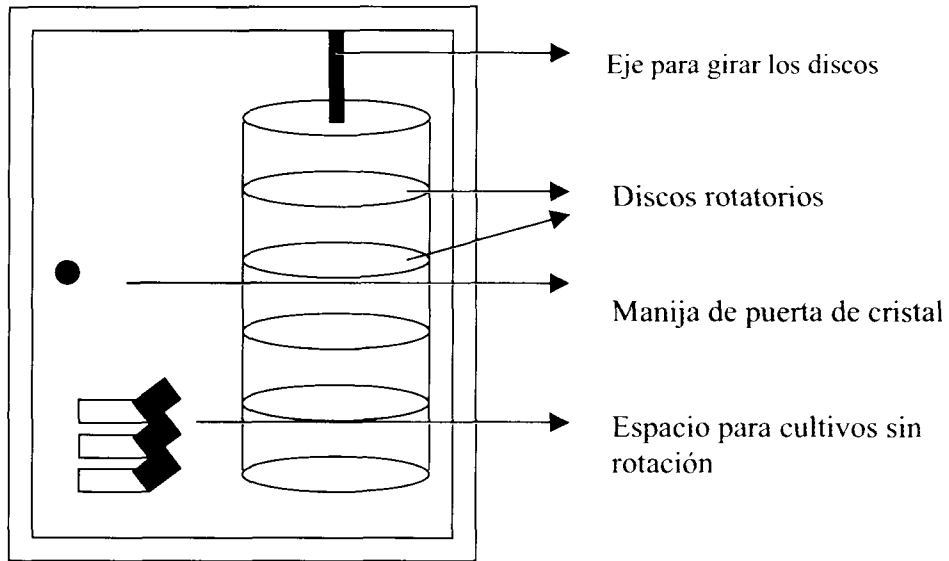


Fig. 3.1 Diagrama la incubadora de discos rotarios. La incubadora tiene 2 puertas, una de protección (que posee un tablero de control de temperatura y velocidad) y una de cristal que permite la visibilidad al interior.

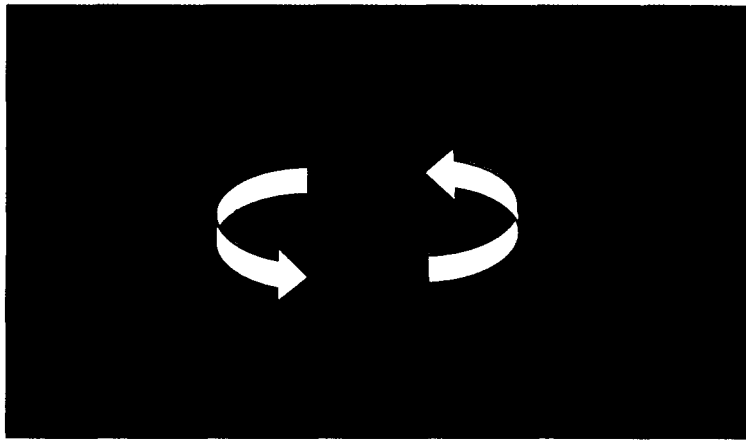


Fig. 3.2 Caja petri de vidrio ($D=14$ cm.) con tres diseños de grabado lineales (horizontal, vertical y diagonal) y una porción lisa; las flechas blancas indican el sentido del flujo rotacional impuesto.

Las células HUVEC fueron cultivadas a 3 RPM, en cajas Petri grabadas con patrones circulares concéntricos, la dirección del flujo impuesto fue en sentido contrario a las manecillas del reloj.

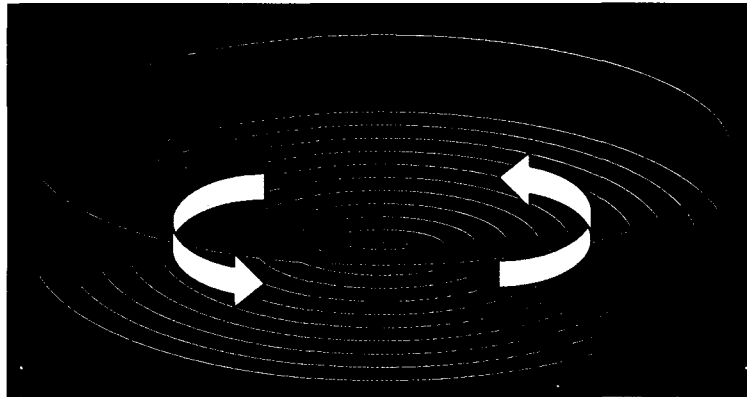


Fig. 3.3 Caja petri de vidrio con grabado de círculos concéntricos.

3.2. MATRIZ DE CONDICIONES PARA LOS EXPERIMENTOS CON DISCOS ROTATORIOS

Se estudiaron los patrones de crecimiento y asociación de dos líneas celulares: células madre obtenidas a partir de fémur de rata, y células endoteliales (Human Vascular Endothelial Cells) obtenidas a partir de cordones umbilicales.

Tabla 3.1 Matriz experimental

Línea celular	Diseño sobre la caja	Velocidad (RPM)
Células madre	3 lineales, 1 liso	0, 3, 5, 8
Células HUVEC	Círculos concéntricos	0, 5

En ambos casos, las líneas celulares se mantuvieron en crecimiento durante 168 hrs. según es descrito en la sección 3.4.1. Transcurrido este tiempo, las células fueron teñidas de acuerdo al protocolo descrito en la sección 3.5.1.

La figura 3.4 ilustra el algoritmo general de protocolos, desde la obtención de las células sujeto de estudio, hasta la documentación fotográfica del proceso de colonización

de cajas y la estimación de las curvas de crecimiento correspondientes a distintas condiciones de cultivo.

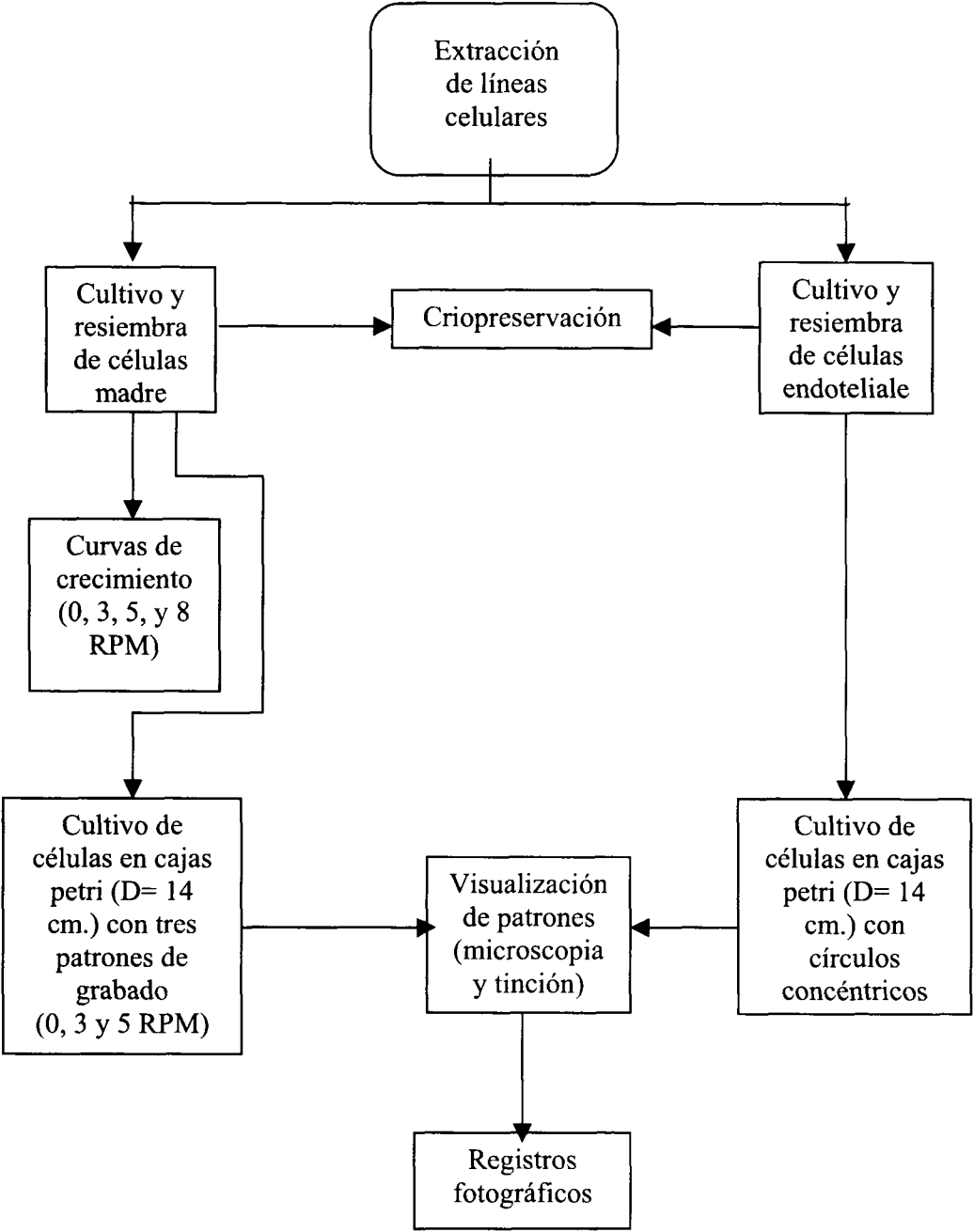


Fig. 3.4 Diagrama de flujo experimental

3.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS

3.3.1. Extracción de células madre

- (a) Se anestesió una rata hembra Spacy D. de aproximadamente 3 meses de edad y de 200 gr. de peso con pentobarbital. Al espécimen se le disectaron los dos fémur. Las células madre se obtuvieron por arrastre con medio DMEM-F12 suplementado con antibióticos (penicilina-estreptomicina al 1%) y suero bovino fetal al 20%.
- (b) De cada fémur diseccionado se recolectaron la sangre en tubos cónicos de 15 ml, se centrifugo durante 10 minutos y se elimino el sobrenadante. El pellet que resultó de la centrifugación se colocó en un tubo cónico de 15 ml que contenía percoll® en un volumen de 1: 2. Se centrifugo por 30 minutos a 340 g.
- (c) Se desechó el sobrenadante visual y las células se resuspendieron en 4ml de medio suplementado con suero fetal bovino. Los tubos se volvieron a centrifugar por 10 minutos.
- (d) Las células obtenidas se resuspendieron en 4 ml y se sembraron en dos cajas Petri con 15 ml. de medio DMEM-F12 (Dulbecco Medio Mínimo Esencial) suplementado con suero fetal bovino y antibióticos.
- (e) Las cajas se incubaron a 37° C en cámara húmeda y 5% de CO₂.
- (f) A las 24 horas de cultivo se cambió el medio para eliminar las células no adherentes.
- (g) Se realizó el seguimiento visual de los cultivos por medio de un microscopio invertido. Una vez que estos estuvieron confluentes se tripsinizaron. Las células se subcultivaron o congelaron hasta su utilización.

3.3.2. Extracción de células endoteliales

Las células endoteliales se obtuvieron de venas de cordones umbilicales humanos de sujetos sanos provistos amablemente por la maternidad “Lolita”. Los cordones se colectaron en medio M199 (Sigma, M2520), preparado para el transporte, y se mantuvieron a 4 °C hasta procesamiento.

Para la extracción se utilizó el método de Gimbrone *et al.*, (1974).

- (a) En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar), los cordones se limpiaron con etanol al 75% y gasas estériles y se canalizaron ambos extremos de la vena de cada cordón.
- (b) La vena se lavó con 10 ml de PBS (pH 7.2) para eliminar residuos de sangre. Para la disgregación de las células endoteliales, la vena se incubó con 10 ml de HSS-0.2 % colagenasa tipo II (Gibco BRL), durante 15-20 minutos a 37 °C, y se recuperaron centrifugando a 900 rpm durante 5 minutos, en tubos con 10 ml de medio de transporte.
- (c) El botón celular se resuspendió con 3 ml de medio M199 suplementado [20 % SFB (Gibco 12318-020), 5 U/ml heparina, 1% solución de antibióticos (Sigma, 100X), 10 mM HEPES, 2 mM glutamina y 0.40 µg/ml de factor de crecimiento de células endoteliales (Sigma)].
- (d) Las células endoteliales de cada cordón se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm² y se mantuvieron a 37 °C, con humedad relativa del 95 % y una atmósfera de 7 % bióxido de carbono-93 % aire, hasta alcanzar la confluencia. Y entonces, fueron subcultivadas para obtener un número de células endoteliales suficiente para los ensayos.

3.4. TÉCNICAS DE CULTIVO Y PRESERVACIÓN

3.4.1. Cultivo de células (madre y endoteliales)

Las células endoteliales y células madre se mantuvieron en crecimiento hasta alcanzar confluencia en botellas de cultivo de 25 cm² y cajas Petri de vidrio (D =10 cm.) respectivamente. Se realizó cambio de medio cada tres días. Los frascos de cultivo y cajas Petri confluentes fueron sometidos al protocolo de resiembra descrito en la sección 3.4.2. Las células de resguardo fueron sometidas al protocolo de criopreservación descrito en la sección 3.4.3.

- (a) En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) se retiró cuidadosamente el medio de cada uno de los frascos de cultivo y cajas Petri de vidrio (D =10 cm.), según sea el caso.
- (b) A las células HUVEC se les agregó nuevo medio M199 completo [20 % SBF (Gibco, 12318-020) 0.40 μ gr/ ml de VEGF (Sigma, E2759)] templado a 37 °C (4 ml a cada uno de los frascos). A las células madre se les agregó nuevo medio IMDM (Sigma, I3390) templado a 37 °C [9 ml de M-IMDM y 1 ml de SBF (Gibco, 12318-020)].
- (c) Los cultivos se sometieron a incubación a 37 °C en un ambiente con 7% de CO² y 85 % de humedad relativa.

3.4.2. Resiembra de células

Cuando se observa confluencia al microscopio en los frascos de cultivo y en las cajas Petri, es necesario transferir a las células a nuevos recipientes de cultivo con el fin de evitar desprendimiento celular.

- (a) En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar), se retiró cuidadosamente el medio de cada uno de los frascos de cultivo y/o cajas Petri de vidrio (D =10 cm.), según sea el caso.
- (b) Se lavó un par de veces con PBS templado (37 °C, pH =7.2) para eliminar los residuos de SBF y evitar inhibir la acción de la tripsina.
- (c) Se agregaron 5 ml de tripsina a cada uno de los frascos de cultivo y de las cajas Petri, estas se incubaron a 37 °C durante 5 min.
- (d) A fin de inhibir la acción de la tripsina se agregó 1 ml de SBF a cada uno los frascos de cultivo y cajas Petri.
- (e) La suspensión celular se colocó en tubos cónicos de 15 ml. y se centrifugó a 1500 RPM por 10 min.
- (f) Se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se diluyó en M-199 completo y medio IMDM, según corresponda.
- (g) Se colocó la nueva suspensión celular en frascos de cultivo y cajas Petri, y se añadió mas medio de cultivo para obtener un volumen final de 4 ml de M-199

completo, para el caso de las células HUVEC, y 10 ml de M-IMDM suplementado con 10 % de SBF.

- (h) Se incubaron los cultivos a condiciones de 37 °C con 7 % de CO₂ y 85 % de humedad relativa.

3.4.3. Criopreservación de líneas celulares

- (a) En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar), se retiró el medio de cultivo y se lavó un par de veces con PBS (pH =7.2) a fin de eliminar los residuos de SFB y no interferir con la acción de la tripsina.
- (b) Se agregaron 5 ml y 10 ml de tripsina (Gibco, 15050-057), para los frascos de cultivo 25 cm², cajas Petri de D =10 cm. y cajas Petri grabadas de D =14 cm., según corresponda. Se incubaron durante 5 minutos.
- (c) Transcurrido este tiempo se inhibió la acción de la tripsina agregando 1 y 2 ml de SBF (Gibco 12318-020). La suspensión celular se centrifugó a 1200 RPM durante 10 minutos.
- (d) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio de congelación (DMSO 10% y SFB 90% o SBF 20% y medio 70%).
- (e) Los viales de criopreservación permanecen 30 minutos a 4 °C, 2 hrs a -20 °C y 24 hrs. a -80 °C. Después de este proceso se colocan en el tanque de nitrógeno líquido.

3.5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

3.5.1. Métodos de visualización (tinción y microscopía)

- (a) Transcurridas 168 horas a partir de que fueron colocadas las células en la caja Petri de vidrio con textura (D= 14cm.), se retiró el medio de cultivo de cada una de estas cajas.
- (b) Se lavó perfectamente con PBS (pH =7.2) un par de veces.
- (c) Se agregaron 7 ml de Propidium® (Fluka, 4560) a cada una de las cajas, procurando exponer lo menos posible este reactivo a la luz.

- (d) Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad durante 10 min.
- (e) Transcurrido este tiempo se retiró el Propidium® y se colocan unas gotas de Glicerol-PBS al 80% hasta cubrir la totalidad de la superficie de cada una de las cajas de cultivo.
- (f) Se colocaron cuidadosamente los cubreobjetos (Fisher Scientific, 14X50 mm.).
- (g) Se observaron al microscopio de fluorescencia (Olympus, AH-3) con filtro IB, y lente 20 X.
- (h) Se tomaron los registros fotográficos correspondientes.

3.5.2. Estimación de curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento a distintas velocidades rotacionales se evaluaron en microplacas de 24 pozos (Corning Incorporated, 3526). Las dimensiones de estas placas se presentan en la figura 3.5.

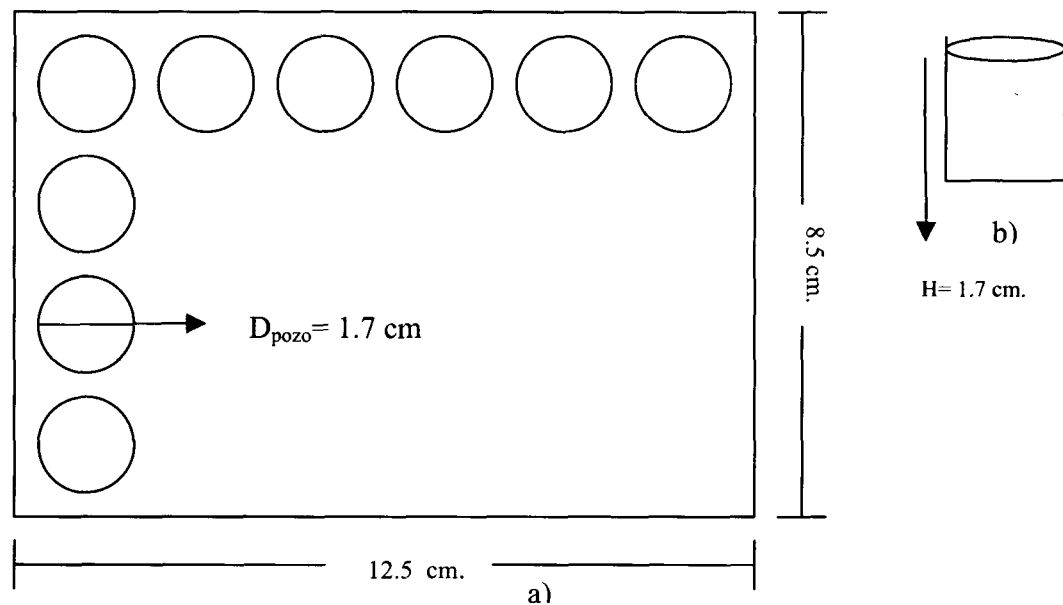


Fig. 3.5 Diagrama de microplaca de 24 pozos. (a) Vista superior de la microplaca. (b) Vista lateral de un pozo de la microplaca.

- (a) Bajo condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) se retiró el medio de cultivo de la caja Petri sujeto de análisis. La capa celular se lavó un par de veces con PBS (pH =7.2). Se agregaron 5 ml. de tripsina (Gibco 15050-057), y se incubó por 5 min. a 37 °C.
- (b) Transcurrida la incubación, se inhibió la acción de la tripsina con 1 ml de SBF (Gibco, 12318-020). Se tomó una pequeña muestra de la suspensión celular, y el resto de esta se centrifugó por 10 min. a 1500 RPM. La muestra de suspensión celular se utiliza para el conteo de células en cámara de Neubauer (Marienfeld), para resuspender el pellet que resulte de la centrifugación en el volumen adecuado a fin de tener, en cada uno de los pozos de la microplaca (Corning Incorporated, 3526), una concentración de 1.3×10^4 células/ml.
- (c) Se retiró el sobrenadante que resultó de la centrifugación y el pellet se resuspende en el volumen adecuado. En cada uno de los pozos de la microplaca se coloca una concentración de 1.3×10^4 células /ml., manteniendo siempre el cultivo con medio IMDM (Sigma, I3390) con 10% de SBF (Gibco, 12318-020).
- (d) Cada 24 horas se tripsinizaron 3 pozos de la microplaca y se realizó el conteo de las células en cámara de Neubauer.
- (e) Los resultados de concentración celular contra tiempo se normalizaron por la concentración inicial (de inóculo) y se les aplicó logaritmo natural para linealizarlos y obtener tasas de crecimiento específicas y tiempos de doblaje a distintas condiciones de rotación (ver por ejemplo Bailey Ollis, 1986).

Índice de tablas

Tabla 3.1	Matriz experimental	18
Tabla 4.1	Condensado de concentraciones celulares ($\times 10^4$) a diferentes velocidades (0, 3, 5 y 8 RPM) durante 168 horas.	39
Tabla 4.2	Datos promedio del tiempo de duplicación de las células madre.	42
Tabla 4.3	Tiempos de duplicación de diferentes líneas celulares	42
Tabla 4.4	Velocidades específicas de crecimiento a diferentes velocidades de rotación.	44

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CONTEXTO DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

En la última década, la ingeniería de tejidos a despegado como una de las áreas de mayor interés dentro de las disciplinas biomédicas. La insuficiente oferta de donadores de órganos para los miles de receptores en listas de espera, evidencian la necesidad de encontrar opciones alternas al trasplante. Idealmente, si pudiésemos “cultivar”, o aún mejor, “diseñar” tejidos y órganos funcionales, entonces daríamos un enorme paso al frente en Medicina. Sin embargo, mucho es aun el recorrido necesario en conocimiento fundamental para allanar el camino tecnológico hacia esos logros.

El presente reporte de investigación, es el primer producto publicado de una serie, en que se documentará el estudio de los patrones de crecimiento de células de mamífero (en particular células madre y células endoteliales) expuestas a campos de velocidad rotacional. La hipótesis general que se pretende validar es que es posible controlar la velocidad y los patrones de crecimiento y asociación de células de mamífero empleando campos de velocidad rotacional.

Para demostrar tal hipótesis, se cultivaran células madre y células endoteliales sobre la superficie de discos rotatorios. Se evaluarán los patrones de colonización y asociación celular a distintas velocidades de giro, a distintas distancias del centro del disco, y sobre distintos sustratos de adhesión. Se medirán también velocidades de crecimiento y nivel de expresión de proteínas clave, para determinar el grado de perturbación del estado metabólico normal de las células ante condiciones de cultivo en discos rotatorios. Se correlacionarán nuestras observaciones experimentales con estudios computacionales de campos de velocidad y de estrés mecánico inducido por flujo (“shear stress” en literatura en inglés) a fin de explicar los resultados en términos de efectos de campos de fuerzas. La idea central de esta propuesta es que la aplicación de un campo de velocidad rotacional promovería un incremento adicional en la velocidad de propagación del tejido, proveyendo de un elemento de control de la direccionalidad del crecimiento.

En este reporte, solamente se documentan las observaciones de la primera fase del proyecto de investigación global que se ha descrito. En particular, esta etapa cubre: (a) la implementación de técnicas de cultivo, tinción, y manejo general de los sistemas celulares definidos como modelo experimental; (b) el diseño de la incubadora y placas de cultivo propias para esta investigación; y (c) los primeros resultados experimentales, correspondientes a un estudio de la etapa de colonización celular de superficies de vidrio con textura, reportando la dinámica de crecimiento en las primeras 168 horas posteriores a inoculación.

1.2 JUSTIFICACIÓN, ORIGINALIDAD E IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN

El sistema experimental propuesto es, en nuestro conocimiento, original. Si bien hay bio-reactores de propagación de células de mamífero que son agitados bajo campos rotacionales (botellas rotatorias, reactores de microgravedad), no hay estudios básicos reportados sobre el efecto de campos rotacionales en el desarrollo de células de mamífero. Más aún, no hay antecedente de ningún estudio que proponga explotar el uso de campos de velocidad rotacionales para inducir alineamiento y crecimiento más rápido de tejidos de células de mamífero.

Se seleccionó un sistema de disco rotatorio por su flexibilidad. Dado que a distintos radios la velocidad que experimentarán las células es distinta, en cada experimento podremos imponer una diversidad de condiciones de velocidad y estrés mecánico.

El conocimiento derivado de esta investigación proveerá de estrategias adicionales de control de tasa de crecimiento y orientación del crecimiento celular. El desarrollo experimental propuesto podría generar elementos de conocimiento para proponer un diseño genérico de reactor biológico para cultivo de tejidos específicos de células de mamífero.

La selección de células endoteliales como modelo no es circunstancial. Es conocido que estas células son altamente responsivas a las condiciones de flujo (Sirois *et al.*, 1999), de manera que resultan convenientes para estudiar efectos de campos rotacionales.

Su simplicidad de cultivo ofrece ventajas adicionales para estudiar más limpiamente los efectos que queremos analizar. Por otro lado, los protocolos básicos de conteo y análisis de tasas de proliferación de células endoteliales ya están descritos (Freshney, 2000)

La inclusión de células madre como segundo modelo experimental fue incidental pero afortunado. En nuestro laboratorio teníamos ya líneas de investigación avanzadas en células madre, siendo las técnicas de cultivo y preservación de estas de nuestro dominio. Las células madre son un excelente modelo celular. Por ser células poco diferenciadas, son candidatos de amplio espectro en aplicaciones de ingeniería de tejidos. Cualquier aportación hacia el mejor control de su crecimiento en tejidos tendrá alto potencial aplicativo.

1.3 OBJETIVO GENERAL

El objetivo central de esta investigación es validar la hipótesis de que es posible mejorar las condiciones de colonización de una superficie de cultivo, o la velocidad de crecimiento de células de mamífero en cultivo (en particular células endoteliales y células madre) utilizando como recurso un campo rotacional de flujo.

1.4 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- (1) Construir un prototipo de bioreactor rotatorio horizontal para estudios de cultivo de tejidos de células de mamífero ante campos de flujo rotacional y validar su uso para el caso particular de células endoteliales y células madre.
- (2) Evaluar, analizar y modelar el efecto de campos rotacionales de velocidad en la tasa de crecimiento celular en las primeras 168 horas de cultivo de células endoteliales y células madre.

- (3) Evaluar el efecto de distintos patrones de grabado de superficies de cultivo en los procesos de colonización y crecimiento temprano de células endoteliales y células madre cultivadas bajo el efecto de campos rotacionales de flujo.

2 ANTECEDENTES TÉCNICOS

En este capítulo, se provee al lector de antecedentes técnicos básicos para facilitar la lectura e interpretación de los procedimientos metodológicos y los resultados presentados en subsecuentes capítulos. Sin pretender describir conceptos detalladamente, se refieren generalidades de cultivo de las células de mamífero, características generales de las líneas celulares utilizadas y propiedades de las superficies típicamente utilizadas para cultivo celular.

Adicionalmente, se presenta de una revisión general de contribuciones de otros autores en el contexto de evaluación de efectos de patrones superficiales sobre crecimiento celular, o de campos de flujo sobre orientación o crecimiento celular.

2.1 CONDICIONES CRÍTICAS DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Para crear el microambiente adecuado de crecimiento celular, es necesario mantener ciertas condiciones ambientales. Estas típicamente son reguladas dentro de una incubadora. Existen incubadoras que permiten el control de estas condiciones de manera automática; las hay de diferentes dimensiones de acuerdo al número de niveles para colocar los recipientes de cultivo (los cuales permanecen generalmente inmóviles). Para el presente trabajo de investigación, se diseñó una incubadora prototipo que permitiera, adicionalmente a las funciones de control de variables críticas que se mencionarán posteriormente, imponer un flujo rotacional a las cajas en cultivo (ver sección 3.1.1).

- a) Humedad: Para favorecer el crecimiento celular es recomendable utilizar incubadoras que creen en el microambiente una humedad relativa del 85% (H.R.=85%) (Freshney 2000; Hall *et al.*, 1974; White 1954; Willmer, 1965).
- b) CO₂: La concentración de CO₂ en el proceso de crecimiento celular es importante porque este gas es regulador del pH del medio de cultivo. Los niveles de CO₂ que

con más frecuencia se manejan el cultivos de células de mamífero varían de 5 a 7 % (Freshney 2000; Hall *et al.*, 1974; White 1954; Willmer, 1965).

- c) Temperatura: Esta es sin duda una de las variables más importantes para el desarrollo de cultivos; se debe tener un estricto control de ella. La temperatura recomendada para mantener cultivos celulares es de 37 °C (Freshney 2000; Hall *et al.*, 1974; White 1954; Willmer, 1965).
- d) Composición del medio de cultivo: Los medios de cultivo son mezclas definidas de soluciones estabilizantes, aminoácidos y vitaminas. En el mercado los hay líquidos o en polvo para ser reconstituidos con agua destilada desionizada. El valor de pH adecuado para el medio de cultivo es de 7.4. Cuando se tienen que reconstituir los medios de cultivo se tienen que esterilizar (las presentaciones líquidas de medios ya están estériles) y este procedimiento se hace por filtración (Freshney 2000; Hall *et al.*, 1974; White 1954; Willmer, 1965).
- e) Antibióticos: Son utilizados para evitar que en el cultivo celular crezcan bacterias, levaduras u hongos. Sin embargo, el uso de estos productos es controlado y en muy pequeñas concentraciones (1%), ya que interfieren con el crecimiento celular. Cuando se lleva a cabo el aislamiento de una línea celular, es recomendable el uso de antibióticos hasta el segundo pase, después de este tiempo se puede mantener el cultivo sin antibiótico (Fony, 1873; Freshney 2000; Hall *et al.*, 1974; White 1954; Willmer, 1965).
- f) Factores de crecimiento: Prácticamente para todos los cultivos de células de mamífero que no son utilizados en terapias celulares, se utiliza el suero bovino fetal (SBF) como suplemento, ya que este es rico en factores de crecimiento. Puede también adicionarse otro tipo de factores de crecimiento que sean requeridos específicamente por una línea celular, tal es el caso de las células endoteliales (HUVEC) que requieren factor de crecimiento endotelial (VEGF). (Freshney 2000; Hall *et al.*, 1974; White 1954; Willmer, 1965).

2.2 TECNICAS DE CULTIVO CELULAR

El cultivo de las células de mamífero se inicio desde los primeros años del siglo pasado, fue R. G. Harris (1907) quien obtuvo los primeros cultivos de células de médula espinal de anfibios. A partir de ahí son muchas las mejoras que se han hecho para la optimización de este proceso (Freshney, 2000). Actualmente se puede obtener casi cualquier línea celular en el mercado en la colección americana de tipos de cultivo (por sus siglas en ingles ATCC) o se puede llevar a cabo el proceso de aislamiento a partir de un tejido.

Hay células que crecen en suspensión, por ejemplo hibridomas. La gran mayoría de las células de mamífero son células anclaje dependiente, que crecen adheridas en forma de monocapa sobre la superficie de cultivo, por ejemplo células endoteliales, fibroblastos, madre, tumorales, etc. Mas que un proceso físico la adhesión de células a un sustrato es un proceso bioquímico mediado por receptores, en las que se ven envueltas muchas sustancias. Ocurre por mediación de complejas interacciones entre el citoesqueleto celular y el microambiente extracelular.

No existe, sin embargo, una sola hipótesis que explique de forma general, los procesos de orientación celular y migración dirigida de células en un sustrato texturizado (Pfeiffer *et al.*, 2003). Un mejor entendimiento mecanístico de los procesos de adhesión y orientación de crecimiento en sustratos texturizados podría desde luego dar pauta a un mejor diseño de superficies para implantes.

2.3 SUPERFICIES PARA CRECIMIENTO CELULAR

Existen muchos tipos de materiales que son utilizados como sustratos para el cultivo de células. Se han utilizado superficies de silica (Curtis, *et al.*, 2002), poliestireno (Lu *et al.*, 2003) y sustratos como colágeno (Wang *et al.*, 2002). El más utilizado es el poliestireno, por su calidad óptica; este material es esterilizado por radiación gama y tiene la gran ventaja de ser desechable. El vidrio es utilizado por ser económico, ya que se puede utilizar por mucho tiempo, esterilizándolo a altas temperaturas; sin embargo no es

frecuente su empleo ya que es una superficie demasiado lisa, lo que dificulta la adhesión de las células. El uso de nano estructuras ha sido incorporado al cultivo celular por sus aplicaciones biomédicas (Price *et al.*, 2002; Buttiglieri *et al.*, 2003).

En el presente trabajo de investigación, adaptamos cajas de Petri de vidrio de 14 cm. de diámetro, para cultivar células madre o endoteliales. El fondo de estas cajas será grabado con diferentes patrones, buscando propiciar un mejor anclaje celular.

2.4 CÉLULAS UTILIZADAS EN LA PRESENTE INVESTIGACION

2.4.1 Células madre

Las células madre son células indiferenciadas que se continúan dividiendo por un número determinado de pases. Las células que resultan de estas divisiones pueden diferenciarse en un tipo especial de células (Alberts, 2002). También conocidas como células “stem”, con de gran interés dentro del área de la terapia celular y también son causa de intensos debates éticos (Aclaren, 2002). Se pueden clasificar de acuerdo a la etapa de la cual sean obtenidas y al sistema del cual se deriven (Wayne *et al.*, 1991).

- (a) Células madre embrionarias. El primer paso en el desarrollo del hombre es cuando se lleva a cabo la fertilización del óvulo, produciendo células madre totipotentes (capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula).
- (b) Células madre de blastocito. Después de 7 días de haberse formado el embrión, la estructura se llama blastocito; estas células madre son pluripotentes (pueden diferenciarse casi en cualquier tipo de células).
- (c) Células madre de feto. Ocho semanas después, el embrión se llama feto, estas células son responsables del desarrollo de tejidos y son pluripotentes.
- (d) Células madre de cordón umbilical. El cordón umbilical es el medio mediante el cual el feto recibe los nutrientes de la madre. En el momento del nacimiento este es desprendido. La sangre que se encuentre dentro del cordón contiene células

madre multipotentes que son casi iguales a las que tiene una persona al momento de nacer.

- (e) Células madre de adulto. Estas células madre son multipotentes y pueden extraerse del sistema nervioso, de músculo liso, de hueso, de sangre, piel y principalmente de medula ósea (Chazizadeh y Taichman, 2001).

2.4.2 Células Endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)

Estas células son aplanadas y recubren el interior de los vasos sanguíneos, forman el endotelio vascular que es un epitelio simple. Originalmente se consideraba al tejido endotelial como una barrera que controlaba el flujo de sustancias de la sangre hacia el tejido fuera de los vasos sanguíneos y viceversa. Sin embargo, actualmente se sabe que el endotelio es el órgano más grande de todo el cuerpo y que no solo es una barrera de control (Mcintire *et al.*, 1998).

Ya que forman una superficie lisa, facilitan la circulación de la sangre. Esto evita que la adhesión de células sanguíneas se lleve a cabo; proveyendo de una superficie no-trombogénica para el flujo sanguíneo (Mcintire *et al.*, 1998). Son responsables de una amplia matriz de procesos inmunológicos tales como respuesta inflamatoria, arterioesclerosis y rechazo de implantes (Kreisel *et al.*, 2002). Las células endoteliales son productoras de factores de crecimiento, también liberan sustancias vasodilatadores como el Oxido Nítrico (NO), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y vasoconstrictoras como endotelinas y tromboxano 2 (Wang, 2001, 2002)

Se ha comprobado que las células endoteliales liberan factores solubles que estimulan la autorrenovación de las células madre neuronales, lo cual promueve la neurogénesis y la autorregeneración de células madre (Quin *et al.*, 2004).

Se han reportado diferencias morfológicas, de asociación en tejidos, y de expresión bioquímica en células endoteliales aisladas a partir de distintos tejidos (Craig *et al.*, 1996; Farivar *et al.*, 2003).

Es conocido que las células endoteliales alteran su morfología, su tasa de crecimiento e inclusive su metabolismo en respuesta a estímulos del medio (Cnag, 2002). Particularmente, las células endoteliales son altamente responsivas al estrés mecánico y por tanto a las condiciones de flujo (Fung *et al*, 1993; Liu, 1994). Valores altos de estrés mecánico tangencial (como aquellos característicos de los flujos laminares en venas y arterias) promueven estados de sobrevivencia (latencia) en las células endoteliales, alineamiento en la dirección del flujo y secreción de sustancias que promueven la vasodilatación y la anticoagulación. Sin embargo, cuando algo funciona inadecuadamente a nivel vascular y el flujo laminar se ve alterado (estrés mecánico tangencial bajo o fluctuante), las células endoteliales reaccionan desencadenando procesos de apoptosis celular, cambiando su morfología, o secretando sustancias que promueven la vasoconstricción, la coagulación y la agregación plaquetaria entre algunos problemas médicos (Wang, 2002; Passerini *et al* 2003; Paszkowiak y Dardik, 2003).

2.5 CONTRIBUCIONES RELEVANTES REPORTADAS EN LITERATURA SOBRE PATRONES DE CRECIMIENTO Y ASOCIACION DE CÉLULAS DE MAMIFERO

Muchos estudios recientes documentan el estudio de patrones de crecimiento, [ver por ejemplo Baddii y Politi (1997), o más recientemente Meinhardt, (2003)]. El crecimiento celular *in vitro* ha sido estudiado ampliamente, sin embargo, existen muchas incógnitas aún en el sentido de cómo se organizan las células para formar los tejidos y como estas responden a estímulos del medio para orientar su patrón de crecimiento y asociación. Muchas son las reacciones que se desencadenan para regular el crecimiento y orientación de las células (Meinhardt, 2003), pero sólo una pequeña fracción de los eventos físicos que disparan estos eventos bioquímicos están plenamente identificados. Muchos de los mecanismos bioquímicos en cuestión son aún motivo de investigación (Ambler *et al.*, 2003).

La utilización de sustratos para soporte celular con un micro o nano diseño ha sido motivo de investigación intensa en años recientes en la búsqueda de mejorar y controlar los eventos de adhesión de células a implantes (Eisenbarth *et al.*, 2002) y

mejorar biocompatibilidad de estos (Lu *et al.*, 2003). Es reconocido que las células pueden reaccionar a patrones de relieve en el sustrato (Pfeiffer *et al.*, 2003), y que el relieve que “ven” al desarrollarse para formar tejidos juega entonces un rol central en la direccionalidad de crecimiento. Por ejemplo, Wang *et al.*, (2003) demostró que era posible favorecer un alineamiento de células productoras de colágeno mediante el crecimiento de estas en sustratos grabados. Estos resultados sugieren posibles estrategias de alineación de tejido conectivo para ayudar en la más rápida recuperación de pacientes con ligamentos y tendones dañados.

Existen varias metodologías para manufacturar superficies micrograbadas. Muchas de ellas han sido importadas y/o adaptadas de aquellas para manufacturar circuitos impresos para aplicaciones en electrónica. Por ejemplo., Huang *et al.*, (2003) documentan técnicas de litografía holográfica para grabar superficies de silicio. Esta técnica permite la obtención de patrones bidimensionales regulares en superficies con detalles en el orden de nanoescala.

Se ha propuesto recientemente una metodología para grabar patrones en la microescala sobre superficies de poliestireno modificado utilizando un rayo láser en la frecuencia ultravioleta (Lu *et al.* 2003); en pruebas con células cancerosas escamosas de lengua humana (por sus siglas en ingles HTSCC), su grupo pudo demostrar que la técnica produce texturas cuyas características favorecen el alineamiento del crecimiento celular.

Investigaciones recientes de varios grupos reportan observaciones sobre respuestas específicas (bioquímicas o morfológicas) de células endoteliales ante campos de estrés mecánico tangencial (Mcintire *et al.*, 1998). Se ha trabajado con células endoteliales expuestas a flujos laminares originados en sistemas de placas paralelas, simulando valores típicos de estrés mecánico provocados en las células endoteliales por flujos venosos o arteriales típicos (5 a 25 dinas/cm² respectivamente). La aplicación de estos campos de flujo laminar no provocó ningún cambio apreciable en la morfología de las células durante las primeras 18 horas de exposición. Exposiciones prolongadas a

valores de estrés de 10 dinas/cm² provocaron un elongamiento de las células endoteliales alineándose estas a la dirección del flujo.

En estudios de Sirois *et al.* (1999), células endoteliales fueron expuestas a condiciones de flujo laminar de hasta 1300 ml/min en un pequeño sistema de placas paralelas, observándose que las células modificaban su forma ligeramente elongándose en la dirección del flujo.

Stamata y McIntire (2001) documentaron cambios en el contenido de calcio nuclear y en la geometría del núcleo celular y de la estructura celular como consecuencia de la exposición momentánea a flujos. Se ha propuesto que los cambios en la estructura celular están asociados a un mecanismo de respuesta tendiente a disminuir el área expuesta al flujo para minimizar daños por estrés mecánico, mientras que los cambios en las dimensiones del núcleo pueden ser importantes para modular funciones metabólicas y de crecimiento. Clermont *et al.*, (2002) reporta que células endoteliales son altamente responsivas bioquímicamente a los insultos propios de las cirugías de “bypass”.

Otros autores reportan efectos bioquímicos adicionales del estrés mecánico por flujos: Wang *et al.*, (2003) observó incrementos en la producción de endotelina I en células expuestas a fuerzas de flujo superiores a los 0.48 N/m²; Wang *et al.*, (2003) estudió los patrones de expresión de Angiotensina II; Passerini *et al.*, (2003) realizaron estudios de medición simultánea de niveles de expresión de factores de crecimiento endoteliales en células endoteliales expuestas a estrés por flujo en condiciones relevantes al desarrollo de hiperplasia intimal (estrés variante +/-15 dinas/cm² alrededor del valor medio de 15 dinas/cm²).

Se han utilizado dispositivos rotatorios inspirados en su diseño en un viscosímetro de cono para evaluar la efectividad de materiales (superficies) promotores(as) de adhesión (Sakai-Furukawa *et al.*, 2001). En sus experimentos, estos autores crecieron células endoteliales en distintos biomateriales (i.e. materiales membranosos, matrices

porosas, etc.) y fijaron pequeñas muestras de estos en su dispositivo de cono rotatorio. El desprendimiento de las células endoteliales de los materiales ante el campo rotacional laminar fue evaluado por un método de fluorescencia. Este estudio pretendía sin embargo mostrar la utilización de esta estrategia para evaluar potencial de materiales para ser utilizados como “scaffolds” para ingeniería de tejidos, y no estudiar las respuestas de las células a campos rotacionales.

659669

Lista de abreviaturas

%	Porcentaje
°	Grados
°C	Grados centígrados
μ	Tasa específica de crecimiento
μg	Microgramos
ATCC	Colección americana de tipos de cultivo
BNML	Brown norway leukimia
cm.	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
D	Diámetro
DMSO	Dimetil sulfoxido
dt	Derivada del tiempo
dX	Derivada de la concentración
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
Fig.	Figura
Hec-6	Endometrical adenoacanthoma
HR	Humedad relativa
Hrs.	Horas
HTSCC	Células escamosas de lengua humana
HUVEC	Células endotelilales de vena humana
IMDM	Isccove's modified dulbecos medium
DMEM-F12	Dulbecco medio mínimo esencial
ITESM	Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey
ln	Logaritmo natural
M199	Medio 199
Mex	México
min	Minutos

ml	Militros
mm	Milímetros
MSCs	Células Mesenquimales
MTY	Monterrey
NO	Oxido nítrico
PBS	Buffer de fosfato salino
RPM	Revoluciones por minuto
SBF	Suero bovino fetal
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
X	Concentración celular
X_0	Concentración celular inicial

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las siguientes secciones, se reportan y discuten las observaciones experimentales de las primeras 168 horas de cultivo de células madre y células endoteliales (HUVEC) en cajas Petri de vidrio grabadas en la superficie de adhesión celular, y sometidas a un flujo rotacional. En mi conocimiento, este es el primer reporte de efecto de un campo rotacional de “agitación” sobre células de mamífero creciendo en superficies grabadas. El alcance de los resultados presentados, incluye solamente las primeras 168 horas de cultivo, periodo del que se posee abundante información experimental en cuanto al efecto de distintos patrones y distintas velocidades. Es en esta ventana de tiempo que se efectúa la adhesión de las células al soporte, iniciándose la colonización. El estudio de esta etapa es fundamental para entender cuales son las variables que esencialmente determinan el éxito del crecimiento, la extensión de la fase lag de crecimiento, las características de homogeneidad o heterogeneidad en el crecimiento y la tasa de crecimiento inicial de la fase exponencial. Será objetivo de trabajos posteriores, el análisis de ventanas de tiempo más extensas.

4.1 VISUALIZACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR EN CAJAS ESTÁTICAS Y SIN PATRONES DE GRABADO

4.1.1 Células madre cultivadas a 0 RPM y sobre superficie sin grabado

Se observó que la adhesión de las células madre cultivadas a 0 RPM en caja sin grabado, inició en la superficie de la franja más externa de la caja Petri. Una vez adheridas, las células comenzaron la colonización hacia la parte central de la caja (ver Fig. 4.1).

Es conocido que el crecimiento celular inicia hasta que las células del inóculo están adheridas a la superficie. Algunos autores (vgr. Underwood, 2001) documentan que la adhesión inicial frecuentemente inicia en las orillas de las cajas o frascos de cultivo ya que la mayor confluencia celular se encuentra siempre en las orillas y la menor en el centro del recipiente de cultivo.

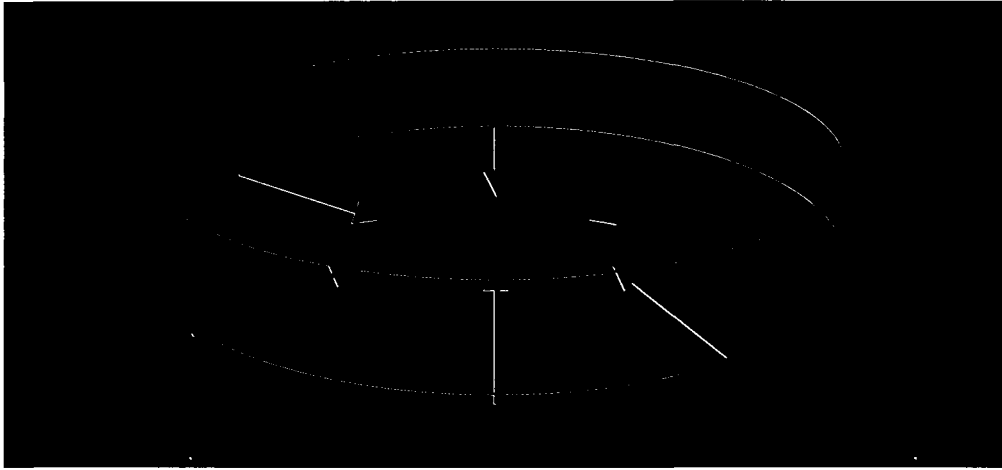


Figura 4.1 Esquema de la adhesión celular de células madre en la orilla hacia el centro de la caja de petri.

Probablemente, las orillas de cajas o frascos favorecen el inicio de la colonización puesto que al pliegue, las células disponen de mayor área de contacto para anclarse. En caso de algún movimiento del recipiente de cultivo (no necesariamente por agitación, puede ser durante el transporte), es el borde de la caja el límite para la migración celular, y por tanto un sitio de frontera en el que pudieran concentrarse las células de inóculo.

En la figura 4.2 se observan células madre adheridas en las orillas de cajas Petri, cultivadas durante 168 horas a 0 RPM en superficies sin grabado (recuerde el lector que en los experimentos con células madre se ensayaron tres distintos grabados en cada caja). El crecimiento inicial se da en forma desorganizada, iniciando la colonización de los bordes hacia el centro de la caja, sin ninguna dirección preferente u organización definida, a pesar de que este tipo de células tiende a formar unidades formadoras de colonia. El crecimiento celular no inicia hasta que las células estén adheridas a la superficie de la caja y a pesar de que el vidrio es demasiado liso, las células crecieron hasta obtener confluencia.

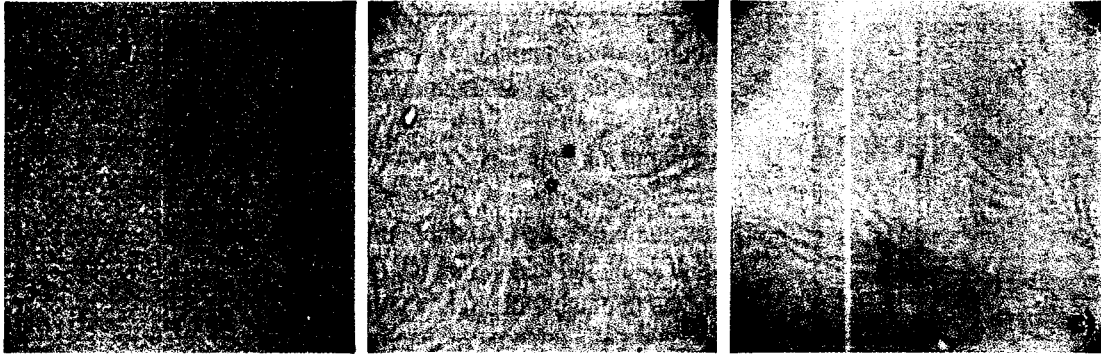


Fig. 4.2 Cultivo de células madre en cajas Petri de vidrio ($D= 10$ cm.) estáticas y sin patrones de grabado. (a), (b) y (c) ilustran células madre a diferentes puntos de los extremos de las cajas de cultivo (la distancia de las células con respecto al centro es aproximadamente de 5 cm).

4.2 CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO CELULAR EN SUPERFICIES CON PATRONES DE GRABADO

4.2.1 Células madre cultivadas a 0 RPM, en superficies con grabado grueso

Lu *et al.* (2003) reportan que el crecimiento celular se ve favorecido cuando las superficies han sido grabadas, dado que la existencia de textura facilita la adhesión celular. La textura (los bordes) que el proceso de grabado genera, evita que las células “resbalen” y favorece entonces el anclaje. Es en especial en los límites del grabado donde las células se adhieren para iniciar el crecimiento. Esto es de gran ayuda para permitir que las células crezcan unas cercanamente o sobre otras sin que exista desprendimiento celular (este es el principio de los scaffolds para formación de tejidos).

En la figura 4.3 se observa el crecimiento de las células madre después de 168 hrs. a 0 RPM en cajas Petri de vidrio ($D= 14$ cm.) cuyas superficies fueron grabadas con tres distintos patrones de grosor ancho (línea: 3mm; espacio entre línea: 1mm). En la Figura 4.3 (a) al centro de la caja, no se observan células, solo las uniones de los patrones de grabado.

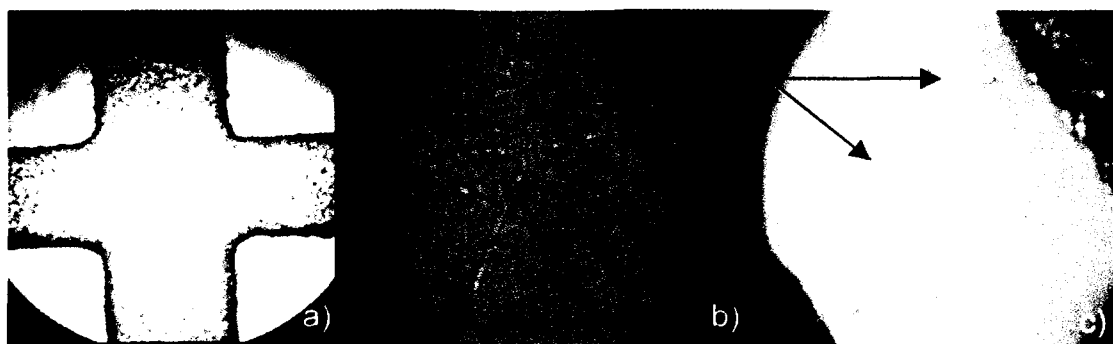


Fig. 4.3 Registros fotográficos de células madre a 0 RPM cultivadas en cajas de vidrio (D= 14 cm.) con 3 patrones de grabados gruesos. (a) centro de la caja petri; (b) en los extremos de la caja y (c) entre las líneas de grabado, cerca de los límites de la caja. La observación es después de 168 hrs. de cultivo.

A pesar de que el grabado favorece el crecimiento celular, el diámetro de la caja es muy grande como para ser confluyente al tiempo establecido. Hacia los extremos de la caja en la superficie lisa de la caja se encontraron células, perfectamente adheridas, lo que sugiere que el crecimiento celular comienza de los extremos al centro. (ver Figura 4.3. (b)). En la región que hay entre cada una de las líneas de grabado cercanas a los límites de la caja Petri, hay células adheridas, lo que demuestra que estas crecen de los extremos hacia el centro de la caja y que tienden a adherirse en los límites de grabado.

4.2.2 Células madre cultivadas a 0 RPM, en superficies con grabado fino

Wang *et al.*, 2002, reporta el crecimiento celular en los relieves creados por estructuras de silicón. El grosor de los relieves utilizados por estos autores era de 10 μm , separados por la misma distancia unos de otros. Esta textura facilitó el crecimiento celular y la formación de una capa de colágeno uniforme.

En la figura 4.4 se observan el crecimiento de las células madre después de 168 hrs. a 0 RPM en cajas Petri de vidrio (D= 14cm.) cuyas superficies fueron grabadas con tres patrones de grosor fino (línea: 1 mm; espacio entre líneas: 0.5mm).

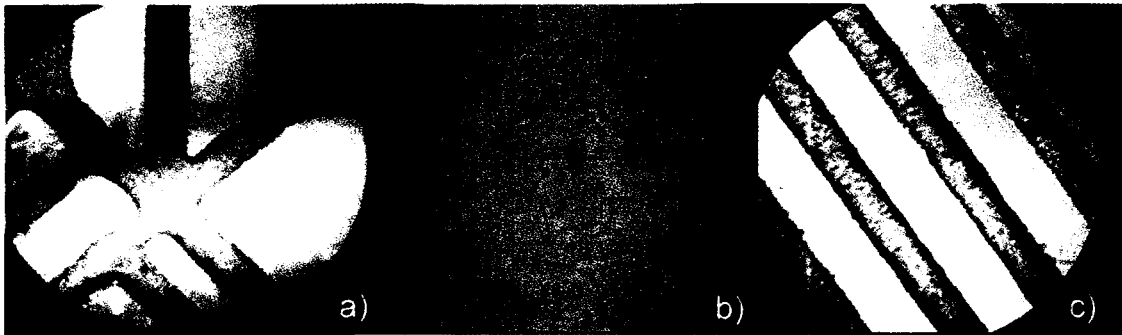


Fig. 4.4 Registros fotográficos de células madre a 0 RPM cultivadas en cajas petri de vidrio (D= 14 cm.) con tres patrones de grabado fino. (a) el centro de la caja; (b) en los extremos de la caja en la parte sin grabado; (c) entre las líneas del grabado, cerca de los límites de la caja.

En el centro de la caja (figura 4.4 (a)), a pesar de que el número de líneas grabadas es mayor, la concentración celular no es mas abundante que cuando se cultivaron en grabado de grosor grueso. En la figura 4.4 (b) las células se concentraron en los extremos de la caja. A los lados de las líneas de grabado que están cerca de los límites de la caja se encuentran células (ver figura 4.4 (c)). Dado que la distancia entre cada una de las líneas es menor al caso anterior, se ven mas células en estos límites (mayor población por unidad de área total).

4.2.3 Células madre cultivadas a 3 RPM sobre grabado grueso

Sirois *et al.* (1999) reportan experimentos donde utilizan un sistema de placas paralelas en las cuales fueron cultivadas células endoteliales sometidas a flujo laminar. El resultado fue el alineamiento de las células con respecto al flujo. Es intención de esta investigación validar un efecto análogo de orientación por flujo rotatorio, o un efecto de incremento en velocidad de colonización o crecimiento.

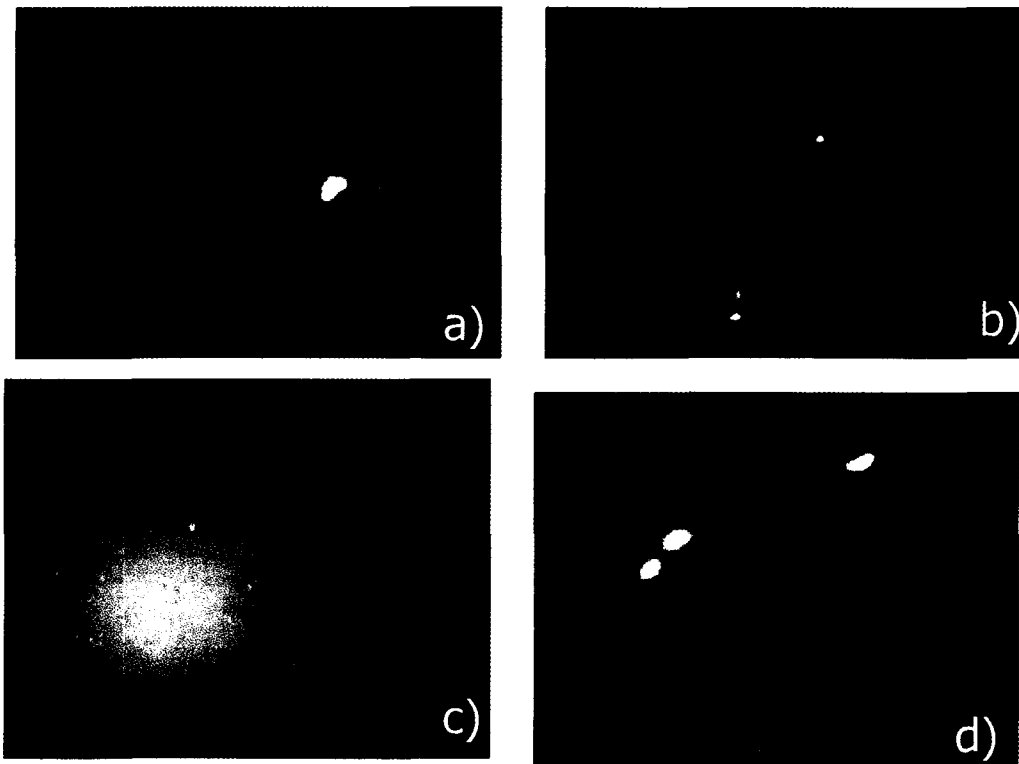


Fig. 4.5 Registros fotográficos de los núcleos de células madre teñidas con Propidium®, cultivadas a 3 RPM en cajas Petri de vidrio (D= 14 cm.) con tres distintos grabados gruesos; (a) patrón de grabado vertical; (b) sin patrón de grabado; (c) patrón de grabado horizontal y (d) patrón de grabado diagonal (45°).

En la figura 4.5 se observan células cultivadas durante 168 hrs. a 3 RPM en cajas Petri de vidrio (D= 14 cm.) cuyas superficies fueron grabadas con tres distintos patrones de grosor ancho (línea: 3mm; espacio entre líneas: 1mm). En la figura 4.5. (a) se observan células que se concentran sobre la línea de grabado. Nuevamente consistente con reportes previos (v.gr. Chennazhy et al., 2005; Lu *et al.*, 2003; Monique *et al.*, 2005), la textura que se genera en las líneas de grabado favorece la adhesión celular, y por tanto la colonización.

En comparación con cultivos en caja estática, en las zonas lisas (ver figura 4.4 (b)), la concentración celular en la franja cercana al borde de la caja es menor. Se evidencia una dispersión más homogénea de las colonias hacia la parte central de la caja. Bajo este

protocolo rotacional de agitación a 3 RPM, las células se concentraron tanto en el interior como en los límites de las líneas de grabados (ver figura 4.5 (c) y 4.5 (d)). En ninguno de los casos se observa orientación celular con respecto al flujo; sin embargo, las células, a pesar de ser diferente la dirección de los patrones de grabado, se adhirieron a los límites de estos. En los bordes de las líneas de grabado que estaban directamente expuestos al flujo del medio, la concentración celular fue mayor a lo que se observa del otro extremo de las líneas.

4.2.4 Células madre cultivadas a 3 RPM, sobre superficies con grabado fino

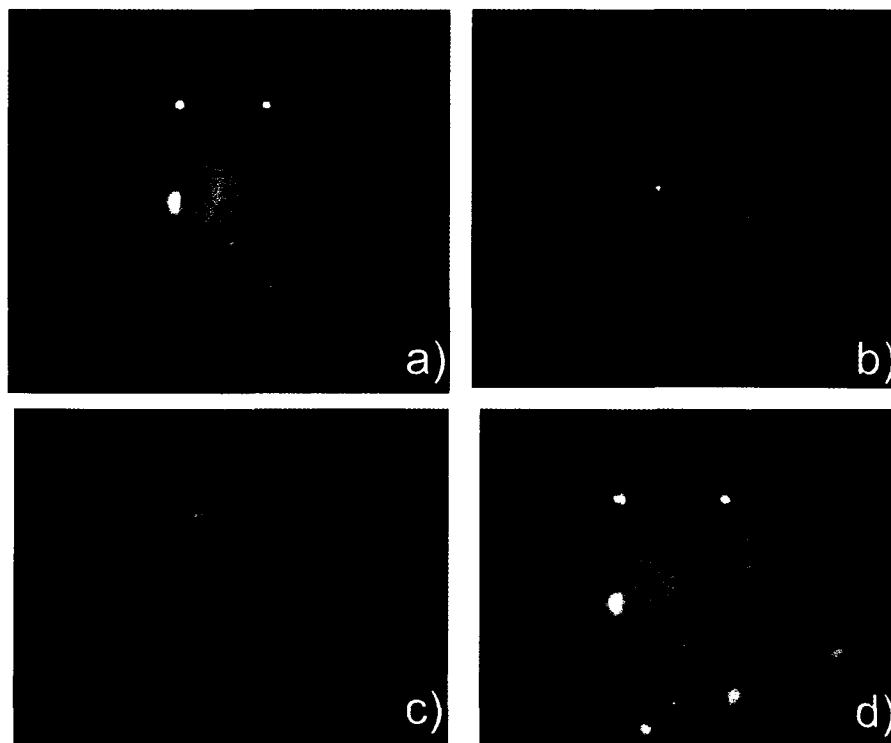


Fig. 4.6 Registros fotográficos de los núcleos de las células madre teñidas con Propidium® y cultivadas a 3 RPM en cajas Petri de vidrio (D= 14cm.) con tres patrones de cultivo fino. (a) patrón de grabado vertical, (b) sin patrón de grabado, (c) patrón de grabado horizontal y (d) patrón de grabado diagonal (45°).

En la figura 4.6 se observan las células cultivadas durante 168 hrs. a 3 RPM en cajas de Petri de vidrio (D= 14 cm.) cuyas superficies fueron grabadas con tres patrones de

grosor fino (línea: 1mm; espacio entre líneas: 0.5 mm). En los recuadros (a), (c) y (d) de la figura 4.6, se observa que las células se adhirieron en la frontera de las líneas de grabado con las regiones lisas (entre líneas) y en el interior de las líneas de grabado, sin importar cual fuera la dirección de las líneas de grabado ni del flujo. Las células que crecieron en la superficie lisa, (figura 4.6 (b)) al igual que aquellas ancladas en las áreas de grabado, no se concentraron solamente en la franja más externa de la caja de cultivo, sino que se observan dispersas homogéneamente por toda la caja.

4.2.5 Células madre cultivadas a 5 RPM, en superficies con grabado grueso

Esta bien documentado que las células responden a campos de flujo. Por ejemplo, Sirois *et al.*, (2001), reporta que es posible lograr orientación celular cuando los cultivos son sometidos a flujos de hasta 1300 ml/min en un sistema de placas paralelas. Siendo que a 5 RPM el flujo es más intenso que a 3 RPM, esperaríamos observar patrones de colonización diferentes. Las observaciones aquí presentadas corresponden a esa hipótesis.

En la figura 4.7 se observan células que fueron cultivadas durante 168 hrs. a 5 RPM en cajas Petri de vidrio (D= 14 cm.) cuyas superficies fueron grabadas con tres distintos patrones de grabado grueso (recuadros (a), (c) y (d)). Las células iniciaron la colonización preferentemente en los bordes de las líneas de grabado; se encontraron pocas células en el interior de las líneas de grabado, posiblemente porque el flujo ahí es suficientemente intenso impidiéndoles colonizar estas áreas.

El lector recordara que a 3 RPM, las células colonizaban tanto en los bordes de las líneas como sobre ellas. La intensidad del flujo es probablemente suficiente para desfavorecer colonizaciones en las zonas mas “turbulentas” en la microescala, aquella especialmente relevante al tamaño celular. Los bordes de las líneas de grabado no expuestas al flujo, son zonas protegidas, de baja intensidad turbulenta. En estas zonas de menor velocidad local, mas fácilmente podrán las células anclarse.

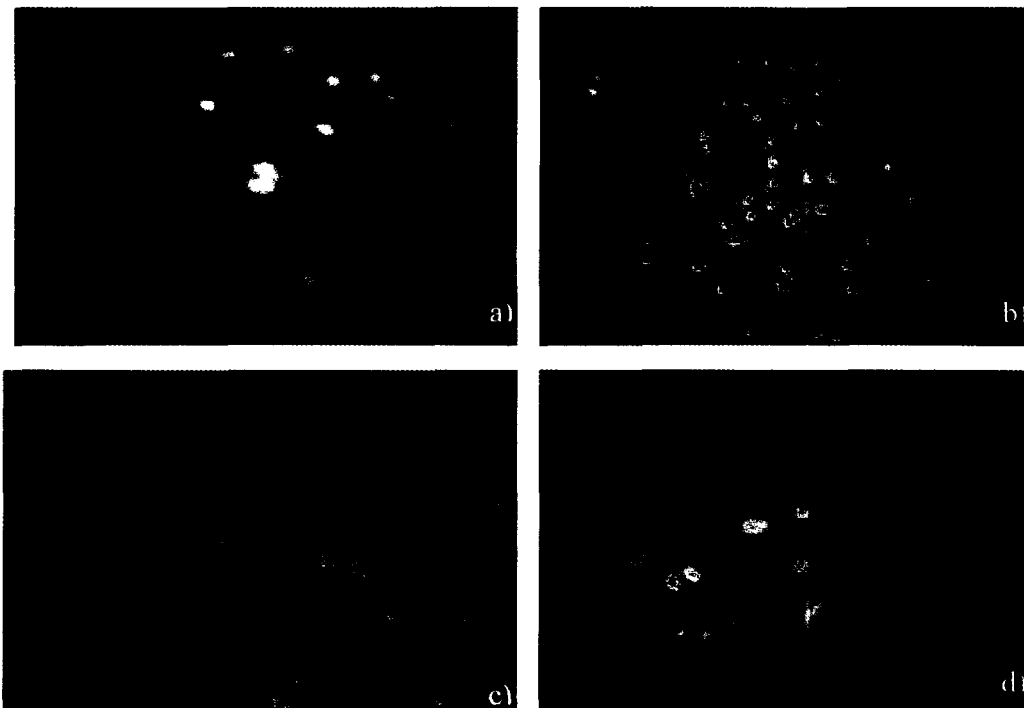


Fig. 4.7 Registros fotográficos de los núcleos de células madre teñidas con Propidium® y cultivadas en cajas petri de vidrio (D= 14 cm.) con tres tipos de grabado grueso a 5 RPM: (a) patrón de grabado horizontal, (b) sin patrón de grabado, (c) patrón de grabado vertical y (d) patrón de grabado diagonal (45°).

Se especula que a 3 RPM, el umbral de velocidades locales en la microescala que dificulta el anclaje, aun no se rebasa, observándose entonces colonización mas generalizada.

4.2.6 Células madre cultivadas a 5 RPM sobre superficies con grabado fino

En la figura 4.8 se observan las células que se cultivaron durante 168 hrs. en cajas Petri de vidrio (D= 14cm.) con tres patrones distintos de grabado fino (línea: 1mm; espacio entre líneas: 0.5 mm) a 5 RPM. Obsérvese en la figura 4.8 (a),(c) y (d) que las células se adhirieron en el interior de las líneas de grabado.

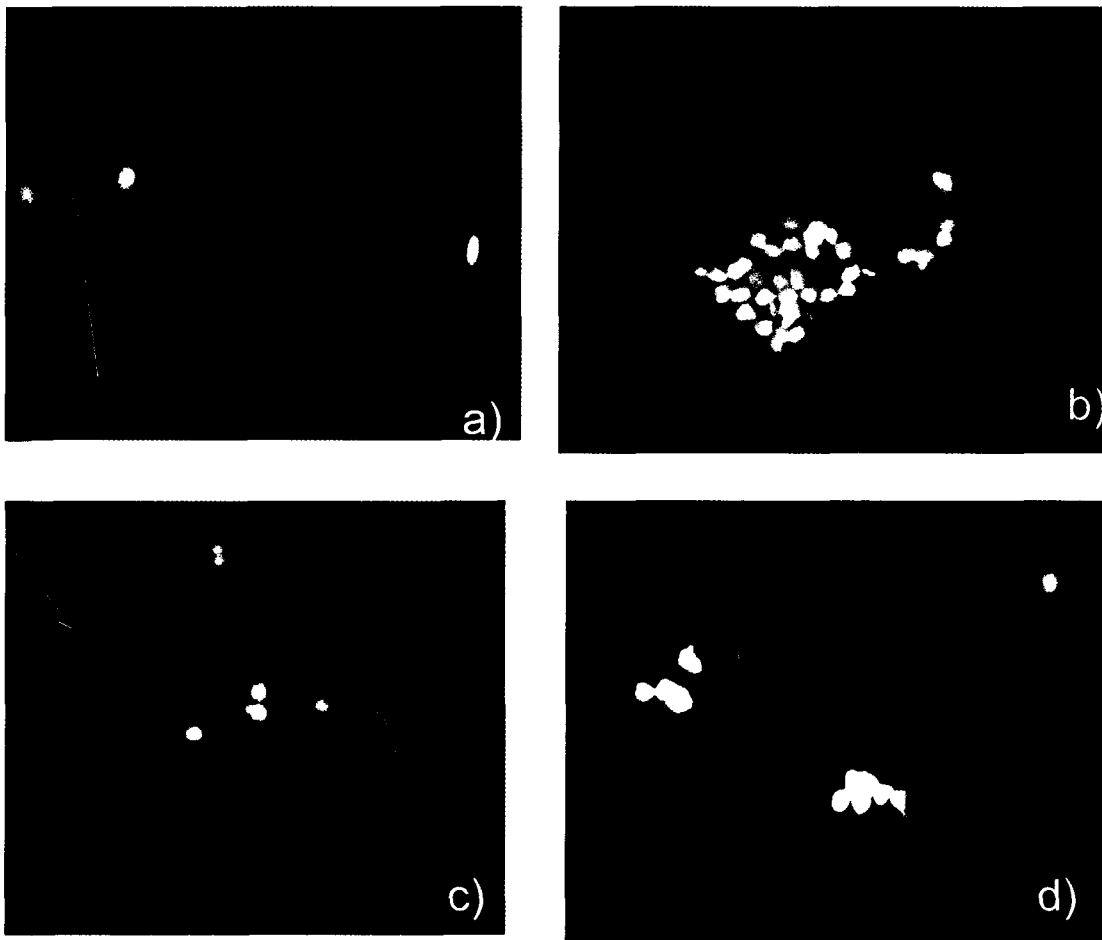


Fig. 4.8 Registros fotográficos de células madre cuyos núcleos fueron teñidos con Propidium® y cultivadas en cajas petri de vidrio (D= 14 cm.) con tres tipos de grabados finos. (a) patrón de grabado horizontal, (b) sin patrón de grabado, (c) patrón de grabado vertical y (d) patrón de grabado diagonal (45°)

Esto contrasta con el caso antes discutido, donde a la misma velocidad rotacional, pero en superficies con grabado grueso, la mayoría de las células se adhiriera en los límites de grabado y no sobre el grabado. En la figura 4.8 (b), correspondiente a una observación representativa en la región lisa de la caja, a pesar de la velocidad (5 RPM) aun se pudieron observar estructuras típicas de las células madre (unidades formadores de colonia).

4.2.7 Células madre cultivadas a 8 RPM

A equivalentes condiciones de inoculación, control de temperatura, composición de medio de cultivo, y control de ambientes de incubación, las cajas de los cultivos mantenidos en rotación a 8 RPM no fueron exitosamente colonizadas. En la sección 4.2.1 se presentaran curvas de población celular que evidencian un decremento de células ancladas con respecto al tiempo en cultivos en microplacas sometidas a 8 RPM. El campo de velocidades debió exceder el umbral que permite colonización exitosa.

4.2.8 Comparación de las condiciones estudiadas

La interacción de las variables estudiadas en este sistema de cultivo (velocidad rotacional, orientación al flujo del relieve de las superficies de cultivo, y espaciamento del relieve) es compleja. Para mejor entenderla, es útil relacionar las observaciones presentadas en las secciones anteriores a la dinámica de flujo-anclaje celular ocuriente en la microescala (distancias características en el orden de 1-20 micras). Las células estudiadas, preferentemente colonizan zonas de baja a moderada intensidad de flujo local. Así, en las cajas estáticas con o sin patrones superficiales, la colonización ocurre.

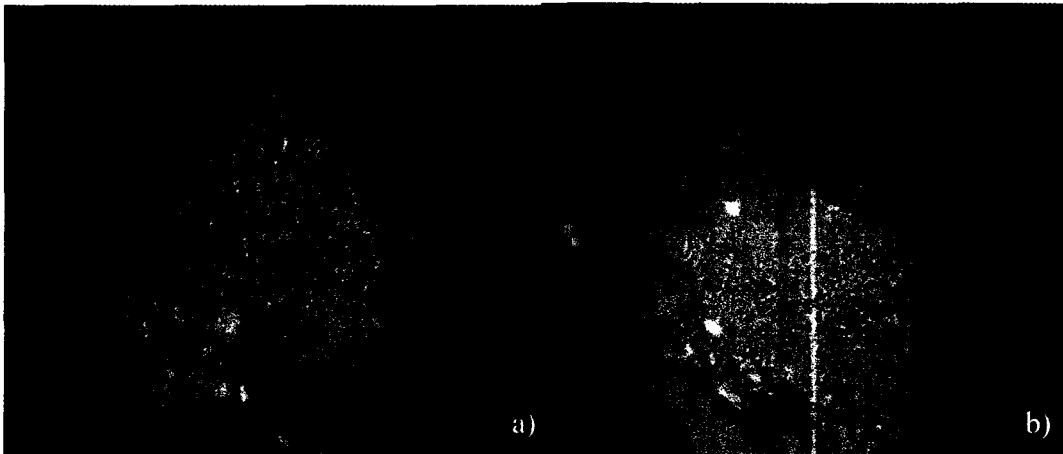
Cuando se impone al cultivo un flujo rotacional, las células colonizan preferencialmente aquellas zonas donde la velocidad local en la microescala es aún suficientemente baja para permitir el anclaje. A condiciones de baja velocidad rotacional (3 RPM), las condiciones de baja velocidad local en la microescala son generalizadas, y la colonización no se ve impedida por este factor. En estas condiciones, la agitación favorece una colonización más homogénea en la coordenada radial. Tanto en las zonas lisas como rugosas de las cajas de cultivo existe colonización, aparentemente solo ligeramente preferencial en las áreas grabadas (bordes de las líneas y sobre las líneas).

En condiciones de moderada velocidad rotacional (5 RPM), se deduce la aparición de zonas en la microescala en donde la velocidad local es tal que excede el umbral máximo que permitiría anclaje celular exitoso. Por tanto, en las cajas de grabado

grueso, la colonización se observa preferentemente en los bordes de los patrones de grabado más que sobre el grabado mismo. Sin embargo, en las cajas cultivadas a 5 RPM pero con grabado fino, la oposición al flujo opuesta por las líneas del grabado es tal, que el campo de velocidades locales en la superficie de la caja disminuye su intensidad con respecto al motivado por grabado grueso (mayor densidad de líneas de grabado por unidad de superficie reduce la velocidad local en la microescala).

Así, en cajas agitadas a 5 RPM con grabado fino, la colonización es más generalizada debido a que hay disponible una mayor superficie donde las velocidades locales no rebasan el límite que permitiría anclaje. A una rotación de 8 RPM, las condiciones de velocidad local en la microescala rebasan, en forma generalizada, el umbral de velocidad que permitiría anclaje. Como consecuencia, la colonización no fue exitosa en esta condición. Las condiciones de rotación óptima deben encontrarse entre 3 y 5 RPM. El umbral máximo de velocidad que permite anclaje, deberá ubicarse entre 5 y 8 RPM.

4.2.9 Células HUVEC cultivadas en cajas con superficies grabadas con patrones circulares concéntricos



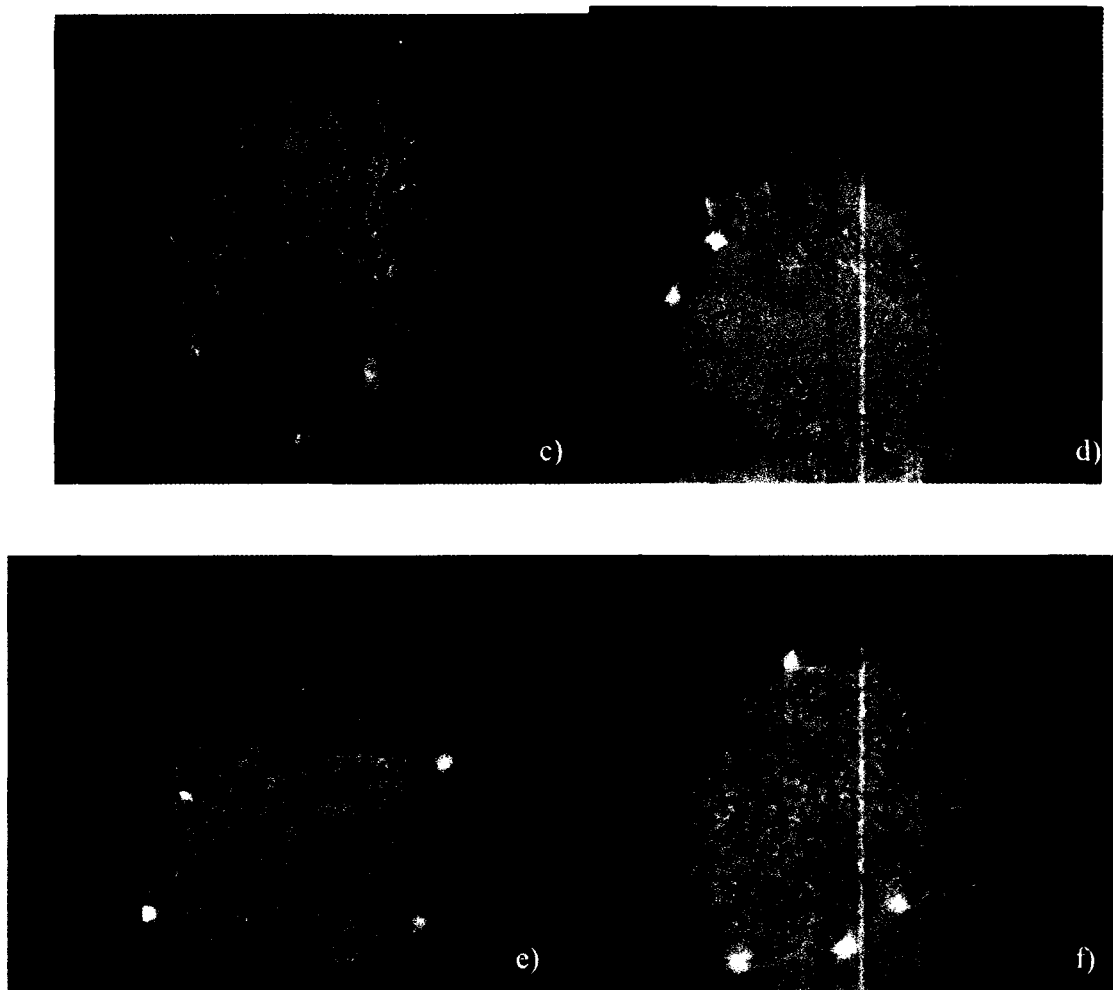


Fig. 4.9 Registros fotográficos de núcleos de células HUVEC teñidas con Propidium® y cultivadas a 3 RPM en cajas petri de vidrio ($D= 14$ cm.) con círculos concéntricos como patrón de grabado, de grosor fino.

En la figura 4.9 se observan las células endoteliales teñidas con Propidium®, cultivadas en cajas Petri de vidrio ($D= 14$ cm.) grabadas con círculos concéntricos de grosor fino. El cultivo estuvo sometido a una rotación de 3 RPM durante 168 hrs. En este caso particular el flujo y las líneas de grabado (en forma de círculos concéntricos) estaban orientados en la misma dirección (las líneas de grabado alineadas a las líneas de flujo), con la intención de inducir alineación del crecimiento celular. Esta estrategia permitió distribuir a las células no solo en los límites del grabado sino dentro de estas líneas. Esta observación confirma que las células pueden orientarse con respecto al flujo tal como lo

reportan los trabajos de Underwood *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2002, Chiu *et al.*, 2003, y que crecen favorablemente en las áreas grabadas (ver por ejemplo Lu *et al.*, 2003).

4.2 PARÁMETROS CINÉTICOS EVALUADOS A DISTINTAS CONDICIONES ROTACIONALES

4.2.1 Curvas de crecimiento

En esta sección, se presentan las curvas de crecimiento estimadas para cultivos expuestos a diferentes niveles de velocidad rotacional. Para dicha estimación, se siguió el protocolo descrito en la sección 3.5.2 para evaluar el crecimiento de las células madre.

Tabla 4.1 Condensado de concentraciones celulares ($\times 10^4$) a diferentes velocidades rotacionales(0, 3, 5 y 8 RPM) durante 168 horas.

Tiempo (hrs)	[$\times 10^4$ cel/ml] 0 RPM	[$\times 10^4$ cel/ml] 3 RPM	[$\times 10^4$ cel/ml] 5 RPM	[$\times 10^4$ cel/ml] 8 RPM
0	1.3	1.3	1.3	2.8
24	1.6	1.8	1.6	2
48	2.4	2.6	2.2	2.2
72	3.4	3.6	3.1	1.5
96	4.2	5	3.9	1.5
120	5.2	6.5	5.2	1.2
144	5.8	9	6.6	0.8
168	7.2	11	8.7	1

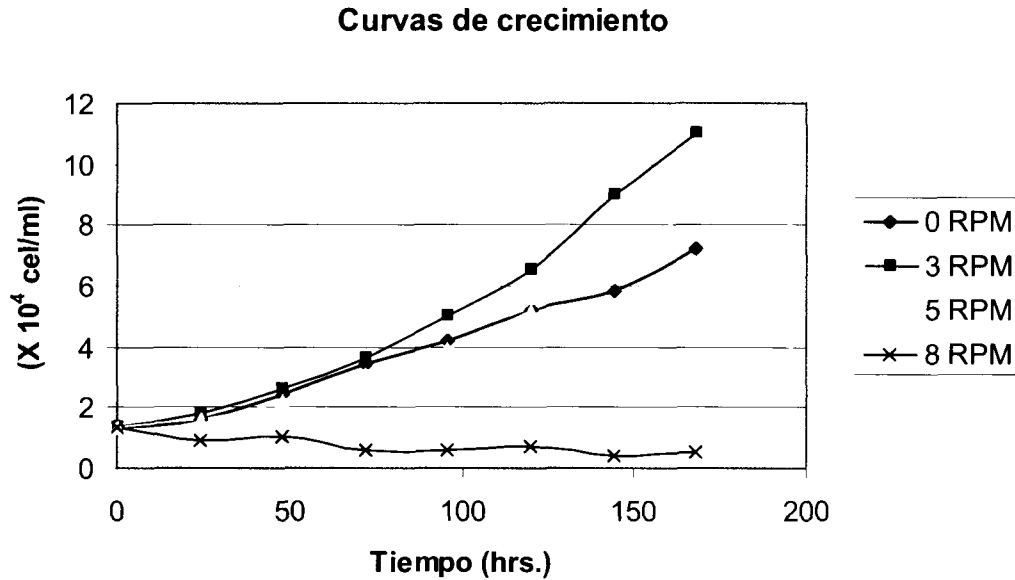


Fig. 4.10 Condensado de curvas de crecimiento (0, 3, 5 y 8 RPM) de células madre cultivadas en placas de micropozos a distintas condiciones rotacionales (0, 3, 5 y 8 RPM).

Para los cultivos estáticos y aquellos rotando a 3 y 5 RPM se observa una tendencia creciente en el número de células ancladas. El proceso de colonización es exitoso. No es este el caso para los cultivos sujetos a rotación a 8 RPM. En tal situación, la concentración celular evoluciona reduciéndose conforme avanza el tiempo.

La figura 4.11 muestra este comportamiento en detalle. El flujo inducido por el movimiento rotacional resulta ser impedimento para el anclaje celular, de manera que las células formadas de *novo* logran adherirse al sustrato. Este resultado es consistente con las observaciones de escasa colonización reportadas para cultivos en discos rotatorios.

En lo que respecta a las condiciones donde se observó colonización exitosa, el lector observará una mayor velocidad de crecimiento en las cajas sometidas a 3 RPM con respecto a aquellas estáticas. Este resultado es evidencia del beneficio de la agitación sobre los cultivos. El flujo rotacional mejora las condiciones de transferencia de masa y con ello las condiciones de crecimiento. El beneficio aportado por la mejora en

transferencia de masa, compite con el hecho de que el campo de velocidad impuesto dificulta el anclaje celular. En los experimentos a 5 RPM, la concentración celular en

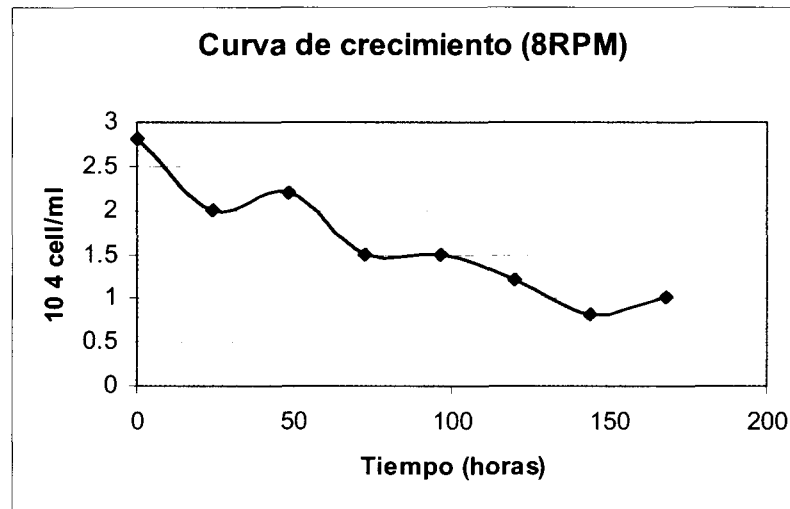


Fig. 4.11 Curva de crecimiento a 8 RPM

tiempos equivalentes es menor a la registrada a 3 RPM y solo ligeramente superior que aquella observada en cajas estáticas (ver figura 4.10). De hecho, el lector podrá observar que, a 5 RPM, el crecimiento celular es ligeramente menor en las primeras horas de colonización con respecto a aquel observado en cajas estáticas. Esto pudiera atribuirse a la menor velocidad de anclaje que experimentan las cajas sometidas a 5 RPM. Aproximadamente a las 120 horas de inoculación, el comportamiento se revierte y la velocidad de crecimiento es superior en cajas con agitación a 5 RPM.

4.2.2 Estimación de tiempos de doblaje

La tabla 4.2 presenta las estimaciones de tiempos de doblaje para distintas condiciones de agitación rotacional. No se presentan resultados para el caso de 8 RPM, puesto que en este escenario la colonización no fue exitosa.

Los reportes de estimación de parámetros cinéticos de células de mamífero son escasos. No se encontró documentación de curvas de crecimiento de líneas celulares sometidas a campos de velocidad en la literatura.

Tabla 4.2 Datos promedio del tiempo de duplicación de las células madre.

RPM	Tiempo de doblaje (horas)
0	37.42
3	35.33
5	36.54

La tabla 4.2 demuestra que el efecto de velocidad en el crecimiento celular fue favorable. En promedio, a 3 y 5 RPM, el tiempo de doblaje fue menor que a 0 RPM.

Tabla 4.3 Tiempos de duplicación de diferentes líneas celulares

Línea celular	Tiempo de doblaje (horas)	Condiciones	Autor
MSCs	48	---	Kidiyala <i>et al.</i> , 1997
Fetal human bone marrow	30	Factores de crecimiento	Fang <i>et al.</i> , 2004
Stem cells	36-72	Factores de crecimiento	D'ppolito <i>et al.</i> , 2004
BNML (Brown Norway Myelocytic Leukimia)	40	---	Lacaze <i>et al.</i> , 2004
Heb-6 (endometrical adenoacanthoma)	52	---	Kuramoto <i>et al.</i> , 2004

La tabla 4.3 contiene información de tiempos de duplicación de líneas celulares a distintas condiciones de cultivo estático. Los tiempos que se reportan a 3 RPM son ligeramente menores a los reportados por D'ppolito *et al.*, (2004). El medio de cultivo que estos autores emplearon estuvo complementado con factores de crecimiento y suero bovino fetal que se utilizó hasta en concentraciones del 20 %. El en caso de las células

madre fetales (Fang *et al.*, 2004) el tiempo de duplicación reportado fue de 30 horas. Es de destacar que las células en etapa fetal son responsables del desarrollo de tejidos y órganos por lo que tienden a reproducirse más rápidamente.

4.2.3 Tasas específicas de crecimiento

Tomando como válida la suposición de que un modelo de tipo $dX/dt = \mu X^1$, (ver por ejemplo Bailey *et al.*, 1986) representará el crecimiento celular en etapas tempranas, se calcularon las tasas de crecimiento específicas $\mu^{[Hr^{-1}]}$ correspondientes a distintas condiciones de rotación. Para tal propósito, se tomaron los datos de concentración de células en el tiempo presentados en la tabla 4.1, y se calculó la variable $(\ln X/X_0)$, donde X es la concentración de células en cierto tiempo, y X_0 es la concentración de células inicial. La dependencia de esta nueva variable normalizada con respecto al tiempo se presenta gráficamente en la figura 4.12. En la misma, se incluyen las ecuaciones correspondientes a cada recta de ajuste y su coeficiente de regresión.

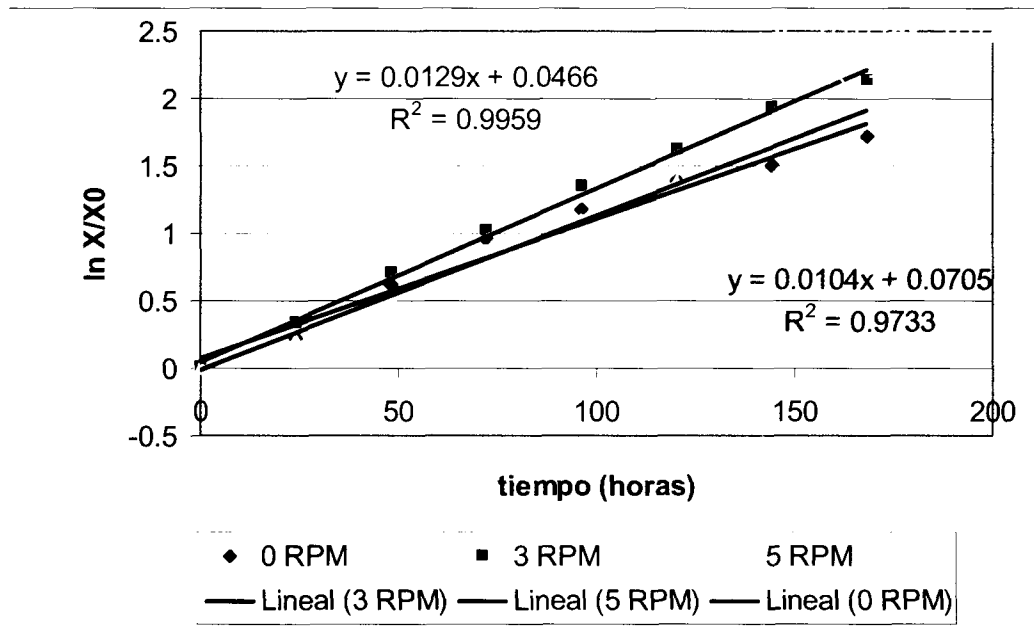


Fig. 4.12 Curvas de regresión para determinar la velocidad específica de crecimiento (μ) a diferentes velocidades (0, 3 y 5 RPM) ajustando a una recta.

¹ En este modelo, X es la concentración celular, t es el tiempo y μ es la tasa específica de crecimiento.

Tabla 4.4 Velocidades específicas de crecimiento a diferentes velocidades de rotación.

Velocidad [RPM]	μ [hrs. ⁻¹]
0	0.0104
3	0.0129
5	0.0115

5 CONCLUSIONES

- 5.1 La literatura señala que es difícil la adhesión celular en cajas de vidrio ya que esta es una superficie demasiado lisa; sin embargo, en este trabajo se demuestra que es posible cultivar células HUVEC y células madre en vidrio.
- 5.2 Se demostró que el crecimiento celular en discos rotatorios a 3 RPM se ve favorecido con respecto a condiciones estáticas. De los resultados aquí presentados se desprende que existe una velocidad óptima de agitación rotacional alrededor del valor de 3 RPM.
- 5.3 A velocidades en el rango de 5 a 8 RPM la importancia relativa del desprendimiento celular se acentúa. De hecho, a 8 RPM las células inoculadas no fueron capaces de colonizar las cajas de cultivo exitosamente.
- 5.4 Las células que no fueron sometidas a campo de velocidad rotacional crecieron de manera desorganizada, iniciando su crecimiento desde la periferia de la caja hasta el centro de esta. Por lo tanto, desarrollaron cultivos poco homogéneos hasta antes de obtener confluencia.
- 5.5 Para los tres patrones de grabado (horizontal, vertical y diagonal) y a 3 RPM, la orientación celular observada predominante fue con respecto a los límites de las líneas de grabado (tanto gruesas como finas), aunque también se observa crecimiento celular dentro de las líneas de grabado. El crecimiento celular fue más homogéneo en toda la superficie en cajas sometidas a campos rotacionales en comparación con lo que se observó a 0 RPM.
- 5.6 A 5 RPM para los tres patrones de grabado, se observaron características muy similares a las encontradas a 3 RPM. Sin embargo, dentro de las líneas de grabado, hubo menor concentración celular, lo que insinúa que las células fueron arrastradas por el campo de velocidad y estas se adhirieron predominantemente a los límites del grabado, las zonas de más baja velocidad local.

- 5.7 En cajas grabadas con círculos concéntricos, situación en que los patrones de textura están alineados al flujo, la colonización celular se observa tanto en los bordes de las líneas de grabado, como sobre estas. Los patrones de colonización son más homogéneos.
- 5.8 Es posible inducir patrones de colonización más homogéneos mediante la imposición de un campo rotacional de flujo, y un diseño apropiado de grabado de las superficies de cultivo. En particular, rotaciones entre 3 y 5 RPM y patrones de grabado concéntricos, favorecieron la velocidad y la homogeneidad de la colonización de células madre y endoteliales sobre las superficies de vidrio.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B., A. Johnson., J. Kewis, M. Raff., K. Roberts, and P. Walter. (2002). Molecular biology of the cell. Fourth edition. Gs Garland Science. 1577 pp.
2. Ambler C. A., Gayle M. Schmunk,a and Victoria L. Bautcha. (2003). Stem cell-derived endothelial cells/progenitors migrate and pattern in the embryo using the VEGF signaling pathway. *Developmental Biology* 257:205-219.
3. Baddi, R. and A. Politi (1997). Complexity: Hierarchical structures and scalling in physics. Cambridge, University Press, 318 pp. ISBN 0-521-41890-9.
4. Clermont G., C. Vergelya, C. de Girarda, L. Rochettea. (2002). Cellular injury associated with cardiopulmonary bypass. *Annales de Cardiologie et d Angéiologie* 51 (2002) 38-43.
5. Craig L.E., Jeffrey P. Spelman, John D. Strandberg and M. Christine Zink(1998) Endothelial Cells from Diverse Tissues Exhibit Differences in Growth and Morphology, *Microvascular Research*, Volume 55, Issue 1, Pages 65-76 .
6. Bayley J and D. Ollis. (1986).Biochemical Engineering Fundamentals. Second edition. Mc Graw Hill. 984 pp
7. Beker, W. M. 1991. World of the cell. 2TH edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, inc. 647 pp.
8. Bray, A., L. Raff and R. Watson. 2002. Biologia molecular de la celula. 3TH edition. Omega. 785 pp.
9. Buttiglieri S., D. Pasqui, M. Migliori, H. Johnstone, S. Affrossman, L. Sereni, M. L. Wratten, R. Barbucci and C. Tetta. 2003. Endothelization and adherence of leucocytes to nanostructured surfaces. *Biomaterials*. 24(16), 2731-2738.
10. Conley B. J., J. C. Young, A. O. Trounson and R. Mollard. 2003. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
11. Curtis A. S. G., B. Casey, J. O. Gallagher, D. Pasqui, M. A. Wood and C. D. W. Wilkinson. 2001. Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important?. *Biophysical Chemistry*. 94(3), 275.
12. D'Ippolito G., S. Diabira1; G. A. Howard, P. Menei, B. A. Roos and P. C. Schiller. (2004). Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential *Journal of Cell Science* 117, 2971-298.
13. Eisenbarth E.,1, P. Linez b, V. Biehl a, D. Velten a, J. Breme a, H.F. Hildebrand (2002). Cell orientation and cytoskeleton organisation on ground titanium surfaces. *Biomolecular Engineering* 19 (2002) 233-237.
14. Fang B., L. Liao , M. Shi , S. Yang and R. Chunhua Zhao. (2004).Multipotency of Flk1⁺CD34⁻ progenitors derived from human fetal bone marrow *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Volume 143, Issue 4, April 2004, Pages 230-240
15. Farivar R.S., Lawrence H. Cohn, Edward G. Soltesz, Tomislav Mihaljevic, James D. Rawn, John G. Byrne. (2003).Transcriptional profiling and growth kinetics of endothelium reveals differences between cells derived from porcine aorta versus aortic valve. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 24 (2003) 527-534.

16. Furukawa K. S., Takashi Ushida, Takayuki Nagase, Hideki Nakamigawa, Takuya Noguchi Tamotsu, Tamak Junzo Tanaka and Tetsu Tateishi, (2001). Quantitative analysis of cell detachment by shear stress *Materials Science and Engineering: C*. Volume 17, Issues 1-2 :55-58.
17. Fong, J. 1973. Contamination in tissue culture. Academic Press Inc (New York and London) Ltd. 463 pp
18. Freshney R. I.(2000). Culture of animal cells. Fourth edition. Wiley-Liss. 557 pp.
19. Hall, O.D., and S.E. Hawkins. 1974. Laboratory manual of cell biology. Crane russak & company, inc. New York. Section 1.
20. Hayakawa K., N. Sato and T. Obinata.(2002) Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching.
21. Hesse F. and R. Wagner. (2002). Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *TIBTECH*. 18: 173-180.
22. Horbett T. A. (1994). The role of adsorbed proteins in animal cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2(1-3): 225-240.
23. Huang C. H., X.P. Zhub, C. Lia, Y.H. Zuoa, B.W. Chenga, D.Z. Lia, L.P. Luo, J.Z. Yua and Q.M. Wanga. (2002). Nanofabrication of grid-patterned substrate by holographic lithography. *Journal of Crystal Growth* 236: 141-144.
24. S. Kadiyala, R. G. Young, M. A. Thiede and S. P. Bruder. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro *Cell Transplantation*, Volume 6, Issue 2, March-April 1997:125-134.
25. Kimball, J.W..(1968). Cell biology. Addison Wesley, series in life Sciences.
26. Kozusko F., and Z. Bajzer. 2003. Combining gompertzian growth and cell population dynamics. *Mathematical Biosciences*. 185: 153-167.
27. Kraling B. M. and J. Bishoff. 1998. A simplified method for growth of human microvascular endothelial cells results in decreased senescence and continued responsiveness to cytokines and growth factors. *In vitro Cellular and Developmental Biology*. 34(4): 308-315.
28. Kuramoto H. and M. Hamano. Establishment and characterization of the cell-line of a human endometrial adenoacanthoma. *European Journal of Cancer* (1965), Volume 13, Issue 3, March 1977: 253-259
29. Lacaze N., G. Gombaud-Saintonge and M. Lanotte. (2003). Conditions controlling long-term proliferation of Brown Norway rat promyelocytic leukemia *in vitro*: Primary growth stimulation by microenvironment and establishment of an autonomous Brown Norway 'leukemic stem cell line. *Leukemia Research*, Volume 7, Issue 2, 1983:145-154
30. Loebel D. A. F, C. M. Watson, R. A. De Young and P. P. L. Tam. (2003). Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. *Developmental Biology*. 2003 Dec 1;264(1):1-14.
31. Lu H. W., Q. H. Lu, W. T. Chen, H. J. Xu and J. Yin. 2004. Cell culturing on nanogrooved polystyrene Petri dish induced by ultraviolet laser irradiation. *Materials Letters*, Volume 58, Issues 1-2, January 2004: 29-32
32. Macintire, L. V., John E. Wagner, María Papadaki, Peggy, A. Whitson and Suzanne G. Eskin. (2003). Effect of Flow on Gene Regulation in Smooth Muscle Cells and

- Macromolecular Transport Across Endothelial Cell Monolayers. *The Biological Bulletin*; Jun 1998; 194, 3: 394-399.
33. McLaren A. 2002. Human embryonic stem cell lines: socio-legal concerns and therapeutic promise. *Biologies*. 325: 1009-1012.
 34. Meinhardt H. 2003. Complex pattern formation by a self-destabilization of established patterns: chemotactic orientation and phyllotaxis as examples. *C. R. Biologies*. 326: 223-237.
 35. Passerini A. G., Amy Milsted, and Stanley E. Rittgers. (2003) Shear stress magnitude and directionality modulate growth factor gene expression in preconditioned vascular endothelial cells. *Journal of Vascular Surgery*. January 2003:182-190.
 36. Paszkowiak J.J.; Alan Dardik (2003). Arterial wall shear stress: Observations from the bench to the bedside. *Vascular and Endovascular Surgery*; Jan/Feb 2003; 37, 1: 47-57.
 37. Pfeiffer F., Bertram Herzog, Dieter Kern, Lutz Scheideler, Jurgen Geis-Gerstorfer, Hartwig Wolburg. (2003). Cell reactions to microstructured implant surfaces. *Microelectronic Engineering* 67-68 (2003): 913-922.
 38. Price R. L., M. C. Waid, K. M. Haberstroh and T. J. Webster.(2003). Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials*. 24(11): 1877-1887.
 39. Qian L. and W. M. Saltzman (2004). Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification. *Biomaterials* 2004;25:1331-1337.
 40. M. Sato, N. Ohshima and R. M. Nerem. (1996) Viscoelastic properties of cultured porcine aortic endothelial cells exposed to shear stress, *Journal of Biomechanics*, Volume 29, Issue 4: 461-467.
 41. Sirois E., J. Charara, J. Ruel, J. C. Dussault, P. Gagnon and C. J. Doillon(1999) Endothelial cells exposed to erythrocytes under shear stress: An in vitro study, *Biomaterials*, Volume 19, Issue 21: 1925-1934
 42. Stamatas G. N, and Larry V. McIntire. (2001) Rapid Flow-Induced Responses in Endothelial Cells. *Biotechnol. Prog.* 2001, 17:383-402
 43. Underwood P. A., P. A. Bean and J. R. Gamble. (2002). Rate of endothelial expansion is controlled by cell:cell adhesion. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 34: 55-69.
 44. Wakatsuki T., and E. L. Elson. (2003). Reciprocal interactions between cells and extracellular matrix during remodeling of tissue constructs. *Biophysical Chemistry*. 100, 593-605.
 45. Wang J. H-C., F. Jia, T. W. Gilbert, S. L-Y. Woo. 2003. Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix. *Journal of Biomechanics*. 36: 97-102.
 46. Wayne M.Becker.(1991).Wordl of the cell. Second edition. The Benjamin/comings Publishing Company, Inc.. 987pp
 47. White, P. R.. 1954. Cultivation of animal and plant cells. 2th edition. The Ronald press company New York. 587 pp.
 48. Willmer, E. N.. (1965). Cells and tissues in culture, methods, biology and physiology. Academic Press Inc (London) Ltd. Volume 1. 593 pp.

Centro de Información-Biblioteca



30002006596696