



Área XIV

Biotechnología de células troncales, terapia celular e ingeniería de tejidos



Contenido

NUEVO ENFOQUE UTILIZANDO SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS EN CULTIVO 3D PARA LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS MADRE Karolina Chairez-Cantu, Mirna González-González, Marco Rito-Palomares	458
GENERACIÓN DE ANDAMIOS DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (P3HB) CON POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR Sandra García-Cerna, U. Abdallah Sánchez-Pacheco, José Manuel Rojas García, Bernardo Fabián Campillo Illanes, Angélica Meneses-Acosta, Carlos F. Peña-Malacara	459
BIORREACTOR ELECTRICO PARA SU APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDO CARDIACO Emmanuel Francisco Solano, Raúl Martínez Memijes, Brayans Becerra Luna, Alvaro R Lara, Eduardo Peña Mercado, Nancy G Viveros Moreno, Mario García-Lorenzana, Nohra E. Beltrán Vargas	460
OPTIMIZACIÓN DEL AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA PARA TERAPIA CELULAR ADOPTIVA Mario A. Téllez-González, Angélica Meneses Acosta, Paul Mondragón-Terán	461
EFFECTO DEL α -TOCOFEROL Y DEL L-ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA DIFERENCIACIÓN NEURAL DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS DE RATÓN (CTEr) Téllez-González MA, Pérez-Müller MA, Martínez-Rodríguez AF, Santillán-Cortez D., Góngora-Rodríguez JMA, Mondragón-Terán P.	462

NUEVO ENFOQUE UTILIZANDO SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS EN CULTIVO 3D PARA LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS MADRE

Karolina Chairez-Cantu, Mirna González-González, Marco Rito-Palomares Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, 64710

mrito@tec.mx

Palabras clave: Sistemas de dos fases acuosas, cultivos 3D, células madre.

Introducción. Los sistemas de dos fases acuosas (SDFA) son una técnica de extracción líquida-líquida que involucra la combinación polímero-polímero o polímero-sal. Las principales aplicaciones han sido la recuperación y purificación de biomoléculas de interés (1). Sin embargo, los cultivos 3D usando SDFA surgieron como un nuevo enfoque biotecnológico para fines de ingeniería de tejidos. Su construcción consiste en el encapsulamiento de las células madre en gotas del polímero 1, las cuales se distribuyen a lo largo de un sustrato junto con el polímero 2, generando patrones específicos (2). Su principal ventaja es la construcción de nichos celulares en donde un microambiente es generado mimetizando condiciones in vivo más acertados (3). Los cultivos 3D usando SDFA se clasifican en: monocultivo, patrón de exclusión, co-cultivo y micropatrones celulares (4). El objetivo del presente trabajo es mejorar la construcción de cultivos 3D usando SDFA para la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) hacia el linaje neural.

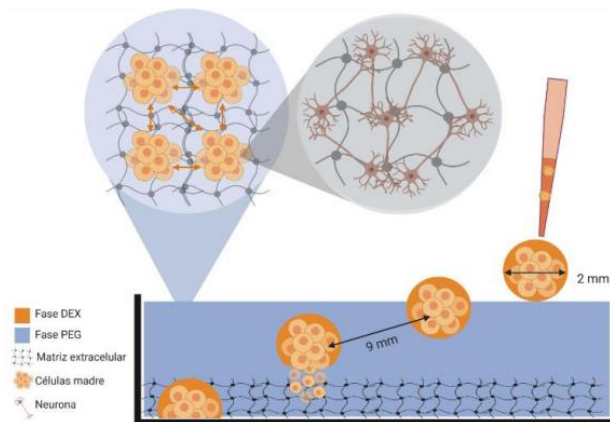


Fig. 2. Construcción de cultivos 3D usando SDFA para la diferenciación neuronal a partir de células madre.

Conclusiones. Los cultivos 3D usando SDFA surgen como una estrategia para superar las limitantes de los cultivos 2D y cultivos 3D a base de andamios celulares, ya que no sólo incrementan la expansión celular sino la eficiencia diferenciación. Además, presentan la ventaja de ser fácilmente escalables y robustos a cualquier linaje celular, representando un paso más cerca para la transición de terapias celulares como tratamiento a enfermedades degenerativas hacia la clínica.

Agradecimiento. Los autores agradecen al Grupo de Investigación de Enfoque Estratégico de Bioingeniería y Medicina Regenerativa de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del Tecnológico de Monterrey. KCC agradece a CONACyT por su beca nacional (845212).

Bibliografía.

- Rito-Palomares M, Benavides J. (2017). General concepts and definitions of aqueous two-phase systems. Aqueous two-phase systems for bioprocess development for the recovery of biological products. Barbosa-Cánovas GV. Springer, EUA. 1- 18.
- Teixeira AG, Agarwal R, Ko KR, Grant-Burt J, Leung BM, Frampton JP. (2018). Adv Healthc Mater. 7
- González-González M, Rito-Palomares M. (2020). J Chem Technol Biotechnol. 95:8-10.
- Chairez Cantu K, González-González M, Rito-Palomares M. (2021). J Chem Technol Biotechnol. 96(1):8-13.

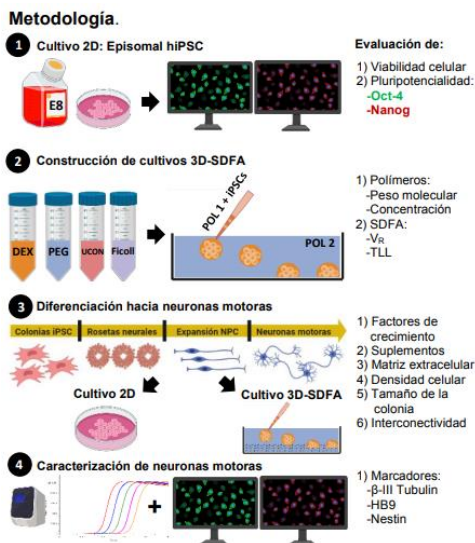


Fig. 1. Estrategia experimental esquematizada y parámetros a evaluar en cada etapa del proyecto.

Resultados. Se espera que los cultivos 3D usando SDFA presenten mayor eficiencia de diferenciación que los cultivos 2D, debido a que existe una mayor interacción entre célula-célula y célula-sustrato (Fig. 2)

GENERACIÓN DE ANDAMIOS DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (P3HB) CON POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

Sandra García-Cerna ^a, U. Abdallah Sánchez-Pacheco ^a, José Manuel Rojas García ^b, Bernardo Fabián Campillo Illanes ^c, Angélica Meneses-Acosta ^a, Carlos F. Peña-Malacara ^d a Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UEAM), Facultad de Farmacia, Cuernavaca C.P. 62209. b Centro de Investigación y Asistencia Técnica del Estado de Querétaro (CIATEQ), Estado de México C.P. 52004. c Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto de Ciencias Físicas (ICF), Cuernavaca C.P. 62210 d Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto de Biotecnología (IBT), Cuernavaca C.P. 62210

angelica.menesesa@uaem.edu.mx; carlos.pena@ibt.unam.mx

Palabras clave: Ingeniería tisular, andamios, Poli-3-hidroxibutirato (P3HB).

Introducción. Actualmente la pérdida de tejidos, fallas orgánicas, enfermedades de la piel y demás casos clínicos constituyen uno de los problemas más frecuentes, devastadores y costosos en los países desarrollados. Para ello se buscan alternativas para solventar estos problemas, siendo la ingeniería tisular una de ellas (1,2,3). El objetivo del presente trabajo fue desarrollar andamios de P3HB por impresión 3D para evaluar su biocompatibilidad con células epidérmicas (queratinocitos de la línea HaCaT), como modelo potencial que permita la formación de un tejido funcional.

Metodología. El presente trabajo se dividió en tres etapas: (i) Recuperación por el método de ruptura y extracción con etanol-acetona de P3HB producido por la cepa mutante OPNA de *Azotobacter vinelandii*, cultivada en un biorreactor en lote de 350 L; (ii) Generación del filamento de P3HB y construcción de andamios y (iii) Caracterización de la línea celular HaCaT y su bioevaluación con los andamios de P3HB.

Resultados. Se obtuvo un biopolímero con las características fisicoquímicas mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del P3HB.

Producto	Pureza (%)	Peso molecular (kDa)	Ángulo de contacto
Control (Hipoclorito/ cloroformo)	99±0.3	416±68	100°
Etanol/ acetona	93±1.0	1,750±98	70°

Con el material recuperado por el método de ruptura y extracción con etanol-acetona, se logró generar un filamento flexible para la construcción de andamios por impresión 3D, sin y con poros (entre 70 y 100 µm) (Figura 1).

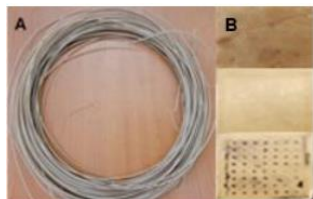


Figura 1. A) Filamento del biopolímero obtenido por el método etanolacetona, B) Andamios de P3HB sin y con poros por impresión 3D

La cinética de crecimiento de la línea celular HaCaT en medio DMEM-F12 y 10 % SFB mostró que los queratinocitos tuvieron un tiempo de duplicación de 32 h y $\mu=0.021 \text{ h}^{-1}$, valores que coinciden con lo reportado para esta línea celular. Las pruebas de biocompatibilidad mostraron que las células proliferaron de manera homogénea en la superficie del andamio sin poros (Figura 2 C), en comparación con el andamio con poros (Figura 2 B) y con el andamio control generado por electrohilado (Figura 2 A), en los cuales las células proliferaron de manera heterogénea.

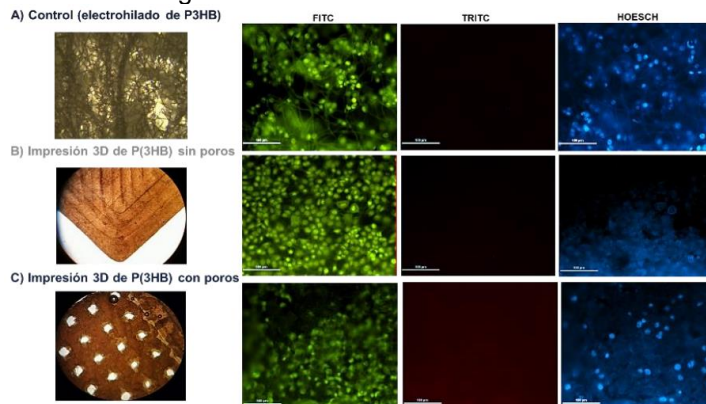


Figura 2. Biocompatibilidad de células HaCaT con andamios de P3HB

Conclusiones. Con el P3HB recuperado mediante el método etanol-acetona se logró generar un filamento con las características idóneas para el desarrollo de andamios por impresión 3D. Estos permitieron el crecimiento homogéneo de las células HaCaT, indicando el potencial de su aplicación en ingeniería tisular para el desarrollo de un tejido funcional.

Agradecimientos. Recursos autogenerados FF-UAEM 2020 y proyecto PAPIIT IG200219. A la UAEM y el IBT-UNAM, así como a la beca CONACYT No. 966686

Bibliografía.

- Falke G.F., Atala A. (2000). Arch Argent Pediatr. 98(2):103-114.
- Nolan K., Millet Y., Ricordi C., Stabler C. L. (2008). Cell Transplantation. 17:241-243.
- Yan W. C., Davoodi P., Vijayavenkataraman S., Tian Y., Cheng Ng W., Fuh J. Y. H., Robinson K., Wang C. H. (2018). Adv. Drug Deliv. Rev. 132:270-295.



BIORREACTOR ELECTRICO PARA SU APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDO CARDIACO.

Emmanuel Francisco Solano, Raúl Martínez Memijes, Brayans Becerra Luna, Alvaro R Lara R., Eduardo Peña Mercado, Nancy G Viveros Moreno, Mario García-Lorenzana, Nohra E. Beltrán Vargas, Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Ciudad de México, C.P. 05300
nbeltran@cua.uam.mx

Palabras clave: biorreactores, ingeniería de tejidos, estimulación eléctrica.

Introducción. De acuerdo con la OMS, la enfermedad isquémica del corazón es la principal causa de muerte en el mundo, responsable del 16 % del total de muertes a nivel mundial [1]. La ingeniería de tejido cardiaco (ITC) busca generar tejido cardiaco in vitro apto para reemplazar o reparar daños en el corazón tras un infarto al miocardio. Para lo cual la ITC hace uso de una fuente celular, un soporte o andamio y un sistema de cultivo: biorreactor. El biorreactor permite proporcionar e imitar un ambiente fisiológico cardiaco donde el tejido está expuesto a tensiones mecánicas y corrientes eléctricas y cuenta con un suministro constante de nutrientes y oxígeno. Los estímulos eléctricos promueven la comunicación célula-célula y un mejor manejo del calcio [2] y la circulación del medio de cultivo permite aumentar la transferencia de masa en el constructo [3]. El objetivo de este trabajo es construir y caracterizar un biorreactor eléctrico para el crecimiento de cardiomiocitos en andamios de alginato-quitosano (0.75- 1.25% p/v).

Metodología. El biorreactor cuenta con un reservorio para el medio de cultivo, mangueras para llevar el medio a la cámara de cultivo, una bomba peristáltica que controla el flujo del medio y la cámara de cultivo con 2 electrodos para poder estimular el constructo. El estimulador eléctrico diseñado basa su operación en un microcontrolador que permite ajustar el voltaje, la corriente, la frecuencia de operación y el ancho del pulso de estimulación. Se calculó el flujo de operación del sistema de acuerdo al tamaño del constructo, el esfuerzo cortante, el número de Reynolds y del Módulo de Thiele como indicadores de la transferencia de masa. Se extrajeron cardiomiocitos de ratas neonatales y se cultivaron en andamios de alginato-quitosano con nanopartículas de oro recubiertas de alginato (NpAu + Alg). Se sembró 1.5 millones de células por andamio. Los andamios se colocaron en placas de 96 pozos con 100 μ l de medio suplementado (M-199 + FBS al 10% + SH al 5% + 1% de penicilina/estreptomomicina). Se revisaron las cajas cada 24 h y se hizo cambio de medio, manteniendo los cultivos por 3 días. Posteriormente se pasaron al biorreactor por 4 días más. Los constructos fueron procesados mediante técnica histológica estandar y fueron teñidos con H-E.

De cada bloque se realizaron 10 cortes transversales de 3 μ m de espesor. Para medir el área celular (μ m²), se seleccionaron 2 cortes por laminilla de los cuales se

digitalizaron 3 zonas del campo de visión en cada uno con un aumento general $\times 100$ para obtener 6 fotomicrografías por constructo.

Resultados. El flujo de operación del reactor se estableció en función de la cantidad de células a sembrar. Se calculó un flujo de 0.105 ml/min que corresponde a un número de Reynolds y módulo de Thiele de $Re = 0.928$ y $\Phi = 7$, respectivamente. Estos parámetros indican que el régimen predominante de transferencia de masa es la difusión y que hay limitaciones de transferencia de masa interna en el constructo. Por lo que se aumentó el flujo a 0.5ml/min ($Re = 4.4$, $\Phi = 7$). Las células fueron estimuladas eléctricamente con valores de voltaje y frecuencia reportados en diversos trabajos de generación de tejido cardiaco 3V, 3Hz y 5 V, 1 Hz [3]. Se generaron esferoides de mayor tamaño al estimular los constructos con 5V y 1Hz, con células de mayor actividad y más funcionales que los constructos obtenidos en cultivos estáticos y en cultivos en el biorreactor estimulado con 3V y 3 Hz.

Conclusiones. Fue posible construir y caracterizar un biorreactor eléctrico para crecimiento de células cardiacas, identificando las condiciones de operación para garantizar el adecuado paso de nutrientes al constructo. La estimulación eléctrica promueve y favorece el crecimiento de células cardiacas en andamios de alginato-quitosano.

Agradecimiento. El proyecto fue financiado por la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTEI) de la Ciudad de México.

Bibliografía

- [1] W. H. O., (2020). The top 10 causes of death, World Health Organization.
- [2] Stoppel W., Kaplan D., y Black D. (2016). Advanced drug delivery reviews. Vol. (96): 135-155.
- [3] Valls-Margarit, et al. (2019). Stem cell reports. Vol. (13): 207- 220.

OPTIMIZACIÓN DEL AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA PARA TERAPIA CELULAR ADOPTIVA.

Mario A. Téllez-González^{1,2} Angélica Meneses Acosta¹, Paul Mondragón-Terán², ¹Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Farmacia, Cuernavaca Morelos, C.P. 62209 ²Centro Médico Nacional 20 de noviembre ISSSTE, Laboratorio de Medicina Regenerativa, CDMX C.P. 03300

Palabras clave: Cultivo primario, Linfocitos T, químicamente definido

Introducción. Las células CAR-T son linfocitos T diseñados químicamente para expresar un receptor quimérico que se dirige a una proteína diana en el rol de antígeno específico, siendo una inmunoterapia dirigida que ha logrado inducir remisiones moleculares en pacientes con neoplasias hematológicas resistentes a la quimioterapia (1). La terapia celular con CAR-T requiere de un elevado número de linfocitos T modificados por lo que el proceso de aislamiento para establecer sistemas de cultivo in vitro es crucial para la investigación básica, diagnóstico clínico y búsqueda de posibles blancos terapéuticos. **Objetivo.** Estandarización de un procedimiento normal de operación rápido, eficaz y seguro para aislamiento, cultivo y expansión clonal de linfocitos T provenientes de sangre periférica.

Metodología. Se realizó la extracción de sangre periférica por punción venosa de donadores sanos, a través de consentimiento informado, mediante el sistema Vacutainer® con tubos de heparina sódica como anticoagulante. A partir de este punto, se realizó una comparativa entre tres métodos de aislamiento (Gradiente de densidad (1), separación magnética (2) y gradiente de densidad más separación magnética). Una vez encontrado el método de aislamiento con mayor pureza y viabilidad. Se evaluó el uso de un medio químicamente definido (Immunocult) contra el medio convencional (RPMI 1640 con 10% de FBS). La caracterización fenotípica fue mediante la técnica de citometría de flujo (CD3+ y CD8+).

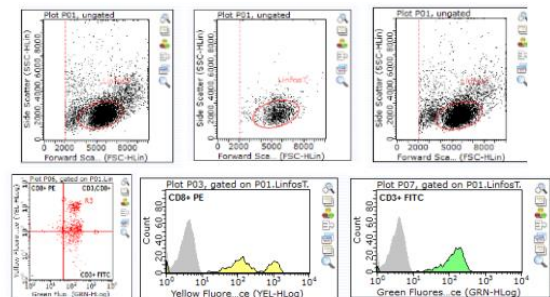


Fig. 2. Caracterización Fenotípica de linfocitos T CD3+, CD8+

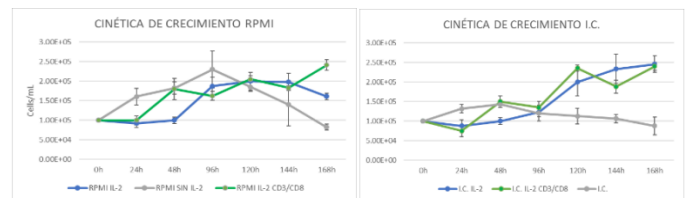


Fig. 3. Cinéticas de crecimiento a 166h de cultivo con el uso de medio con suero fetal bovino y medio químicamente definido, con IL2 (20 U/mL) y activación clonal a las 24h.

Conclusiones. La viabilidad de los tres métodos de aislamiento es mayor al 96% sin embargo mediante el método por separación magnética se obtiene una pureza del 84% mientras que por gradiente de densidad más separación magnética se obtiene un 75% y por gradiente de densidad un 60%. La fase de crecimiento exponencial de los cultivos celulares controles es de 0-48h en medio Immunocult y de 0- 96h en medio RPMI, por otro lado en cultivo con 20U/mL de IL2 se observa una fase exponencial de 96h-144h en medio Immunocult y de 48-96h en medio RPMI. Para la condición de cultivo celular con expansión clonal a las 48h, se observó un comportamiento similar en los dos medios de cultivo llegando a una concentración final de 2.4×10^5 células por mililitro en ambas condiciones.

Agradecimiento. Téllez-González quisiera agradecer a CONACYT por la beca otorgada durante este periodo.

Bibliografía.

- (1) Cummins D & Gill S. (2018) Leukemia & lymphoma, 59(7), 1539-1553
- (2) Cardle I., Cheng L., Jensen C., & Pun H. (2020). Acc. Chem. Res. 53(9), 1724-1738.
- (3) Alack K., Weiss A., Krüger K., Höret M., Schermuly R. Frech T. & Mooren C. (2020). Scientific reports, 10(1), 1-18

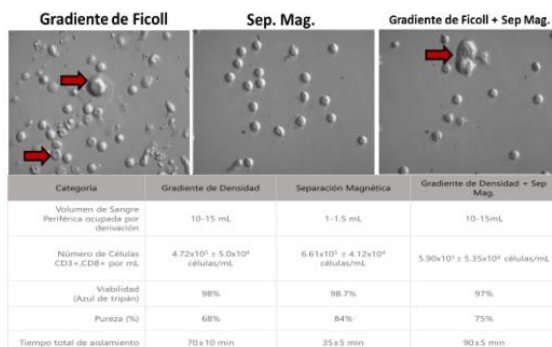


Fig. 1. Comparación entre los métodos de aislamiento. Microfotografías a 40X

EFFECTO DEL α -TOCOFEROL Y DEL L-ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA DIFERENCIACIÓN NEURAL DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS DE RATÓN (CTEr)

Téllez-González MA1 , Pérez-Müeller MA1 , Martínez-Rodríguez AF1 , Santillán-Cortez Daniel1 , Góngora-Rodríguez JMA1 , Mondragón-Terán P 1 . 1Centro Médico Nacional 20 de noviembre ISSSTE, Laboratorio de Medicina Regenerativa, CDMX C.P. 03300

mario.atg91@gmail.com.mx

Palabras clave: antioxidantes, diferenciación neural, CTEr, E14Tg2a

Introducción. Las células troncales embrionarias de ratón (CTEr, línea celular E14Tg2a); son células pluripotentes, que pueden especializarse a cualquier linaje celular de las 3 capas embrionarias por señalizaciones bioquímicas definidas y parcialmente caracterizadas (1). Entre estas señalizaciones se encuentra la actividad funcional de antioxidantes, moléculas que inhiben o retardan reacciones REDOX, evitando daños intracelulares provocados por radicales libres (2). **Objetivo.** Se evaluó el impacto de la adición de α -tocoferol y Ácido ascórbico (L-AA) en medios de diferenciación neural (NDiff 227 y RHB-A) a partir de E14Tg2a como modelo de estudio.

Método. Las células E14Tg2a se mantuvieron en estado de pluripotencia celular durante el proceso de expansión (3). **Diferenciación Neural:** Para los controles, se usaron placas de cultivo (pretratadas con gelatina, laminina o matrigel) de pozos de 3.8cm² con densidad celular de 1.5x10⁴ células•cm⁻² y medio de mantenimiento (NDiff ó RHB-A) durante 192 h de cultivo. **Experimental:** En las placas pretratadas como el control, se le adicionó α -tocoferol y L-AA al medio de cultivo. Por inmunofluorescencia se evaluó la expresión de β III-tubulina y la evidencia de núcleos por expresión de DAPI.

Resultados. A 192 h de cultivo de diferenciación neural a partir de células E14Tg2a en matriz de Laminina y Matrigel puede apreciarse una mayor expresión de β III-tubulina Vs la matriz de gelatina y el medio de diferenciación NDiff.

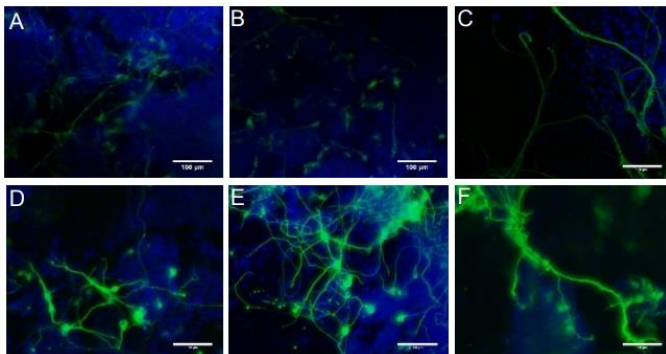


Fig. 1. Efecto de pretratamiento en placas de cultivo, presentando las composiciones armónicas de expresión β III tubulina y Dapi. Diferenciación en medio Ndiff 227(D,H,L; matriz de gelatina, laminina y matrigel respectivamente) Diferenciación con medio RHB-A (P,T,X; matriz de gelatina, laminina y matrigel respectivamente)

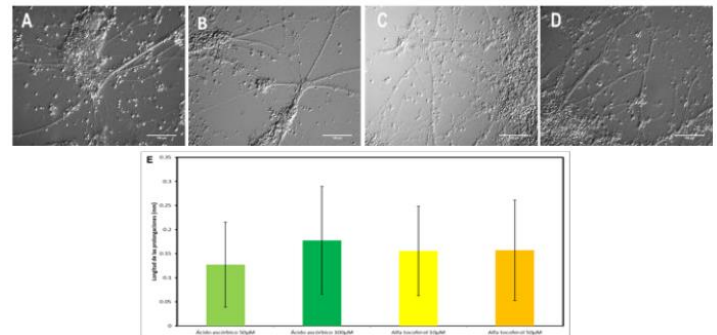


Fig. 2. Evaluación del uso de antioxidantes mediante la medición de longitudes de axones, A-D imágenes ejemplificativas de concentraciones, E) Cuento de número de axones por área (ácido ascórbico 50 μ M, 100 μ M y α -tocoferol 10 μ M, 50 μ M).

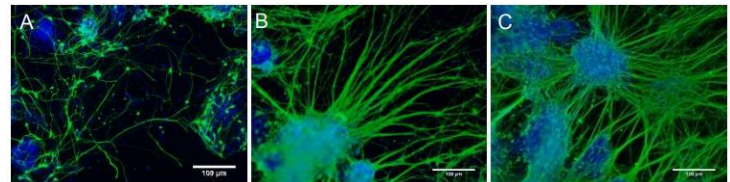


Fig. 3. Efecto del uso de antioxidantes en la neurogénesis de células E14Tg2a en medio de cultivo RHB-A y matriz de laminina. A) Control B) Ácido ascórbico (50 μ M) y C) alfa-tocoferol (50 μ M).

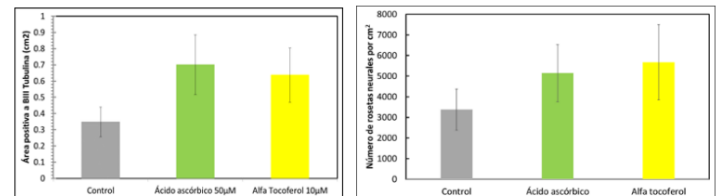


Fig.4. Análisis estadístico del tamaño de axón y número de rosetas por cm² debido al efecto de la exposición de antioxidantes.

Conclusiones. La adición de alfa tocoferol y ácido ascórbico durante el proceso de diferenciación neural, propicia un aumento en el número de rosetas neurales, así como la longitud de axones.

Agradecimiento. Al CMN 20 de Noviembre-ISSSTE, a la EdyN-ISSSTE, PMT agradece los fondos de INFRACONACYT2012/188458, y financiamiento E015.

Bibliografía.

- Betschinger, J. (2017). JML. 429(10):1441-1458.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1995). FRB&M.18(1): 125-126.
- Mondragón-Terán P., Lye G., Veraitch F.(2009). Biotechnol Prog. 25(5):1480-8