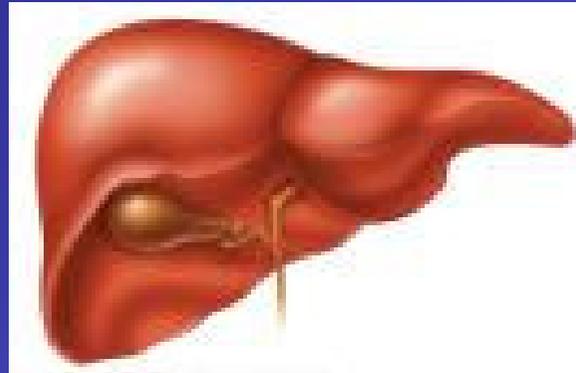


INGENIERÍA DE TEJIDOS APLICADA AL DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO DE HÍGADO BIOARTIFICIAL



FALLA HEPÁTICA FULMINANTE

Síndrome de hepatitis aguda con encefalopatía dentro de las dos semanas del comienzo de la ictericia

Tratamiento definitivo



Tx HEPÁTICO

FALLA HEPÁTICA FULMINANTE

✓ Mortalidad
>80% sin Tx

✓ 25% llega al Tx
con complicaciones

✓ 16% niños
muere en lista

COMPLICACIONES

✓ Coagulopatías

✓ Encefalopatía

✓ Liberación y
acumulación de toxinas

✓ Inestabilidad
hemodinámica

✓ Hipoglucemia

✓ Falla
multiorgánica

CAUSAS DE LA FHF

Hepatitis A, B, D, E, F, G

Varicela Zoster

Epstein-Barr

Virales

Herpes

Paracetamol

Tuberculostáticos

Drogas

Antidepresivos

AINES

Cl_4C

Toxinas

Amanita phalloides

TRASPLANTE
HEPÁTICO



Sobrevida
70-85%

Escasez de
donantes



SISTEMAS DE
SOPORTE HEPÁTICO



FUNCIONES

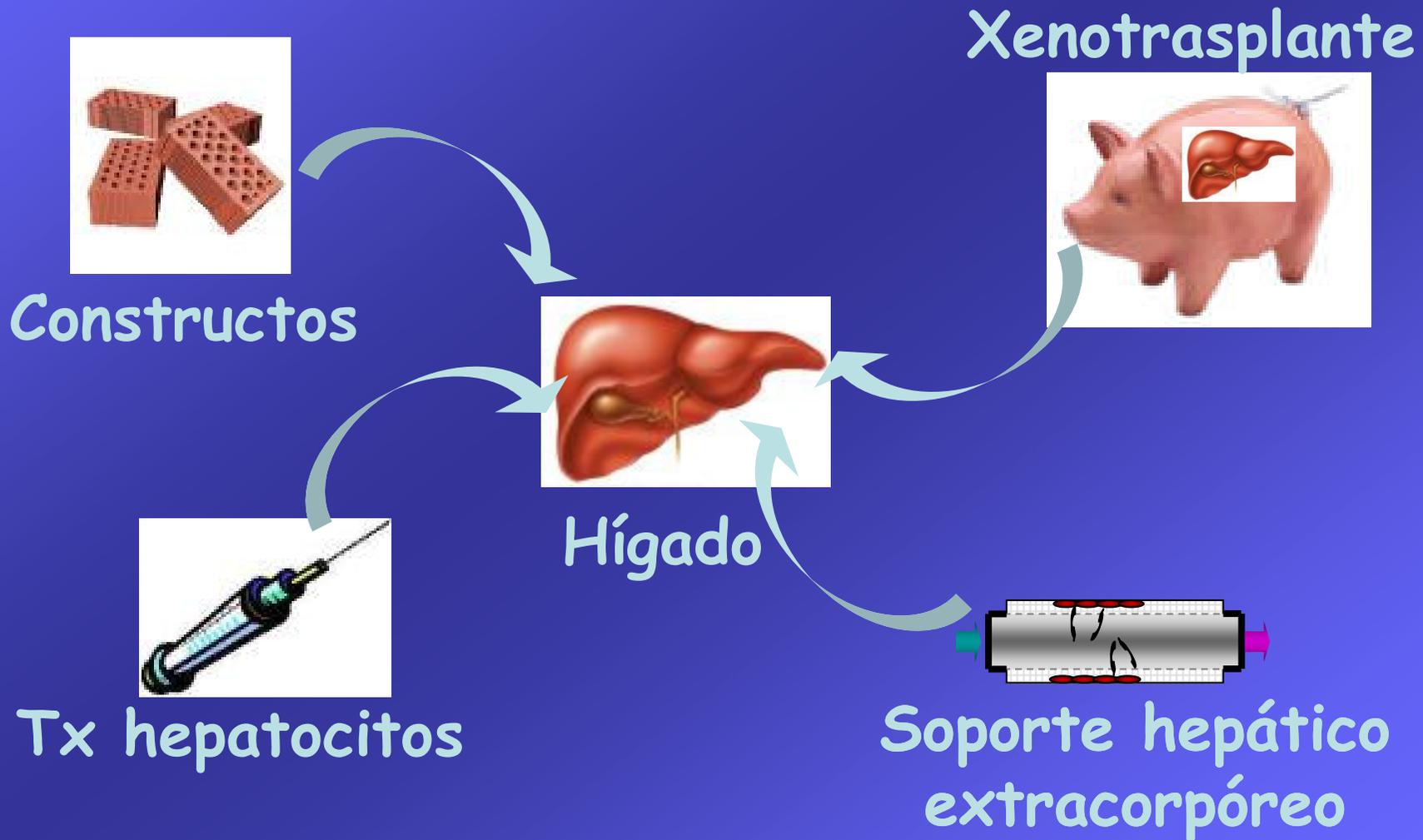
Síntesis

Detoxificación

Soporte de funciones

(Neurológica, renal, hemostática,
hemodinámica)

DISTINTOS ENFOQUES DE SOPORTE HEPÁTICO



SISTEMAS DE SOPORTE HEPÁTICO EXTRACORPÓREO

Artificiales

Hemoperfusión: Por columnas de carbón activado o resinas de intercambio

Hemofiltración: PM, tamaño, forma, carga eléctrica

Plasmaféresis: Separación del plasma

SISTEMAS DE SOPORTE HEPÁTICO EXTRACORPÓREO

Bioartificiales

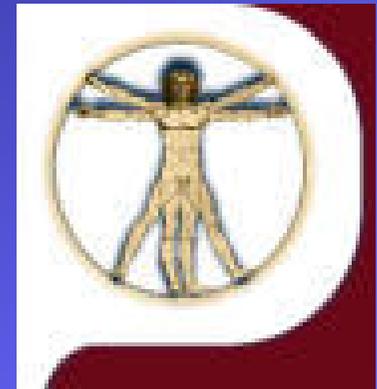
Componente artificial

Componente biológico

SISTEMAS DE SOPORTE HEPÁTICO

PERFUSIÓN CON HÍGADO EXTRACORPÓREO

Homólogo



Heterólogo

PERFUSIÓN CON HÍGADO EXTRACORPÓREO

Alternativa a la escasez
de donantes

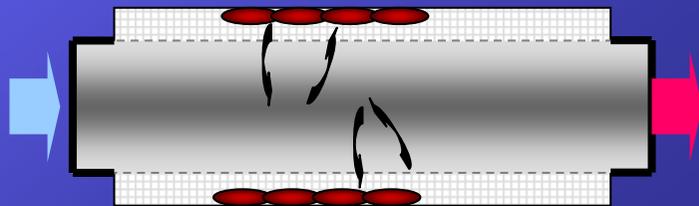
Riesgos: Trasmisión de zoonosis
Rechazo hiperagudo

Solución: Membrana de poliacrilonitrilo
entre el paciente y el órgano

SISTEMAS BIOARTIFICIALES

Componente artificial

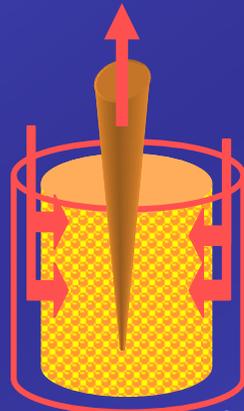
Tipo de soporte



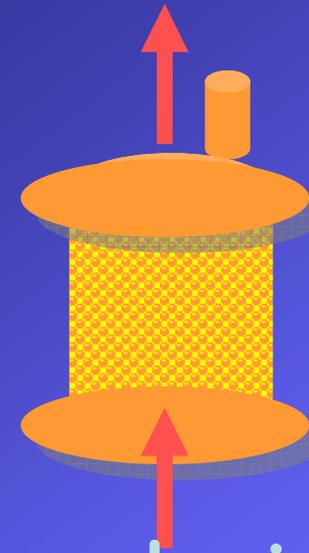
Fibra hueca



Placa plana



Flujo radial,
microcarriers



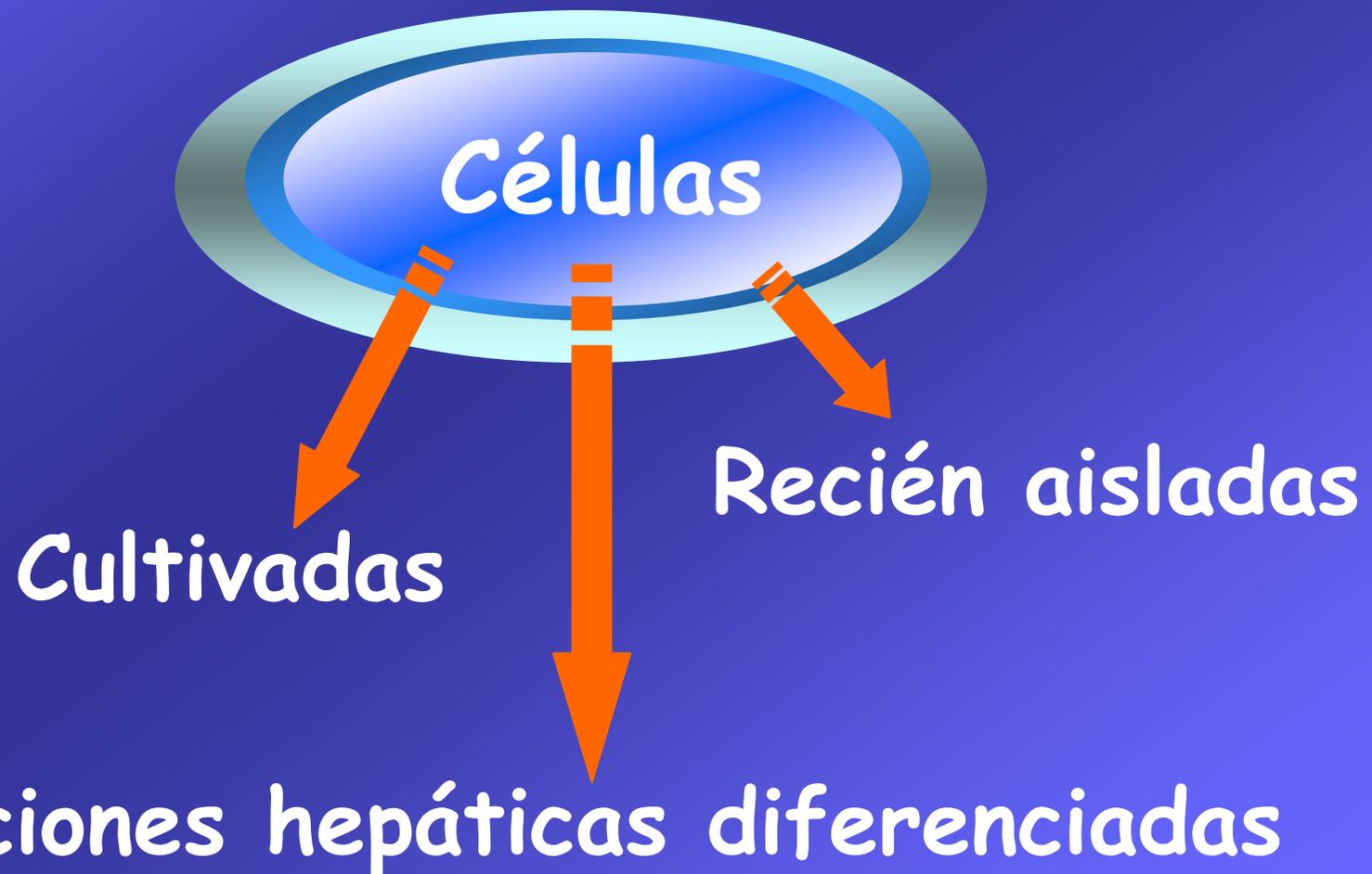
Encapsulamiento
y suspensión

TIPOS DE SOPORTE

Criterios básicos

- ✓ Permitir el transporte de masa bidireccional
- ✓ Mantener la viabilidad y funcionalidad de las células
- ✓ Factible de ser trasladado a nivel clínico

SISTEMAS BIOARTIFICIALES DE SOPORTE HEPÁTICO



HÍGADO BIOARTIFICIAL IDEAL

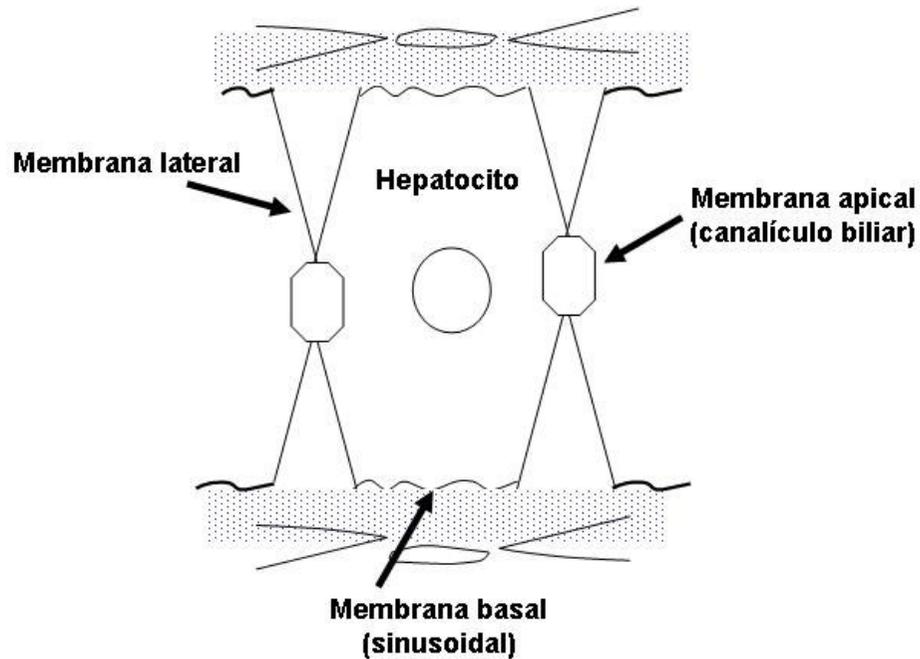
Alto número
de células

Funciones
diferenciadas

Inmunoaislamiento

Polaridad
celular

Polaridad de hepatocitos



✓ Cara apical o canalicular

✓ Cara sinusoidal

✓ Cara lateral

SISTEMAS BIOARTIFICIALES

Componente biológico

Capaces de realizar funciones diferenciadas: funciones características del órgano en cuestión

Probables efectos adversos: procesos inflamatorios, rechazo inmunológico, zoonosis,

Disponibilidad: se requiere gran número de células

SISTEMAS BIOARTIFICIALES

Componente biológico

Células humanas: disponibilidad limitada

Células animales: cantidad de células;
inmunoaislamiento

Células recién aisladas: <tiempo, <gasto,
>pérdida (apoptosis y anoikis)

Células cultivadas: >recuperación y
reorganización de las células; artefactos
de cultivo

SISTEMAS BIOARTIFICIALES

Tipos de células

Células stem Embrionarias
Stem hepáticas
Stem extrahepáticas

Líneas celulares Hepatomas
Hepatocitos normales

Células primarias Recién aisladas
Cultivadas
Humanas
Animales

TIPO	VENTAJA	DESVENTAJA
Primario	extrapolables uso en pacientes	variabilidad
Líneas	reproducibles	tumorigénicas
Stem	obtención ilimitada	aislamiento?

EFFECTOS NEGATIVOS DEL CULTIVO

Cambios
fenotípicos



Marcadores de
diferenciación



Funcionalidad

EFFECTOS NEGATIVOS DEL CULTIVO

SOLUCIONES

Cultivos en tridimensión

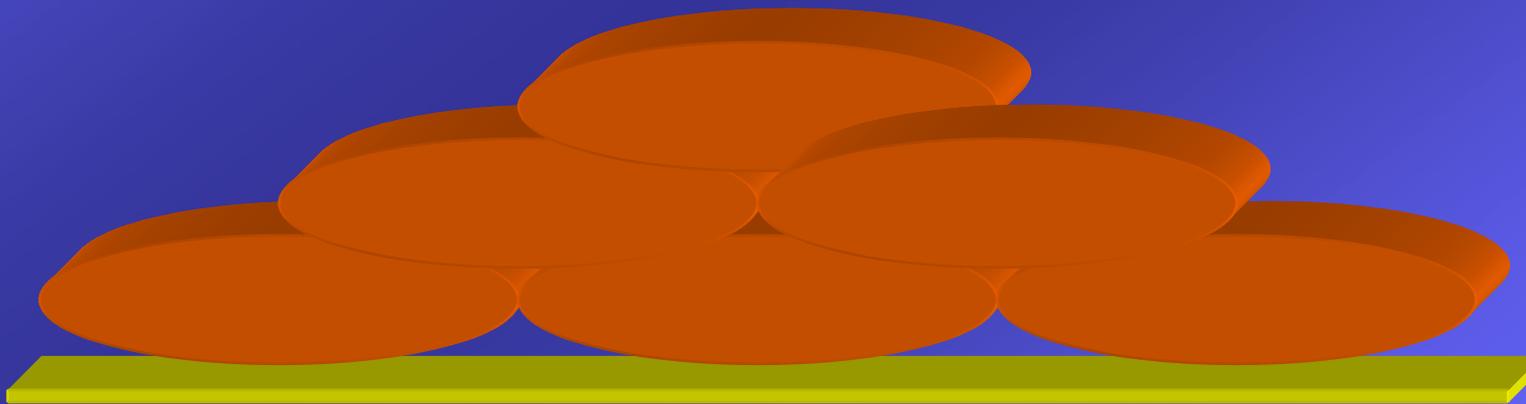
Uso de
matrices

Cultivo en
sandwich

Cultivo de
esferoides

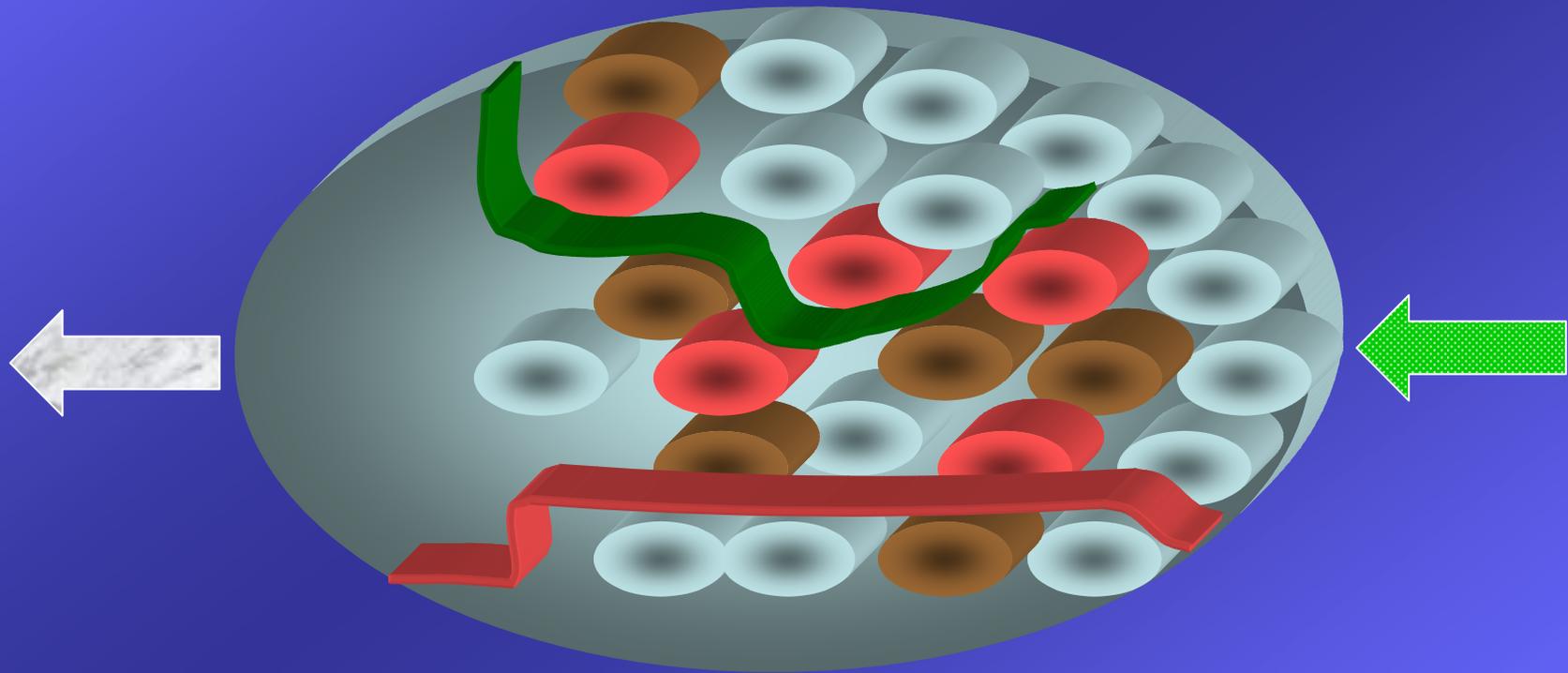
CULTIVOS ESTÁTICOS DE CÉLULAS HEPÁTICAS

Monocapa



Agregado esferoidal estático

ESFEROIDES HEPÁTICOS EN SUSPENSIÓN



Objetivos

- 1- Evaluación de la estructura y ultraestructura de esferoides de células hepáticas porcinas
- 2- Análisis de la polaridad estructural y funcional de las células que los componen
- 3- Evaluación de la funcionalidad de los esferoides in vitro
- 4- Diseño de un modelo simulador para evaluación de los esferoides en un modelo de hígado bioartificial
- 5- Puesta a punto de un modelo de falla hepática fulminante en cerdos
- 6- Prueba del dispositivo de hígado bioartificial en los animales en falla hepática fulminante

AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS PORCINOS

- ✓ Cerdos Landrace (8-12 kg)
- ✓ Canulación por vena porta
- ✓ Primera perfusión in situ con solución salina con EDTA a 4°C
- ✓ Ablación



AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS PORCINOS

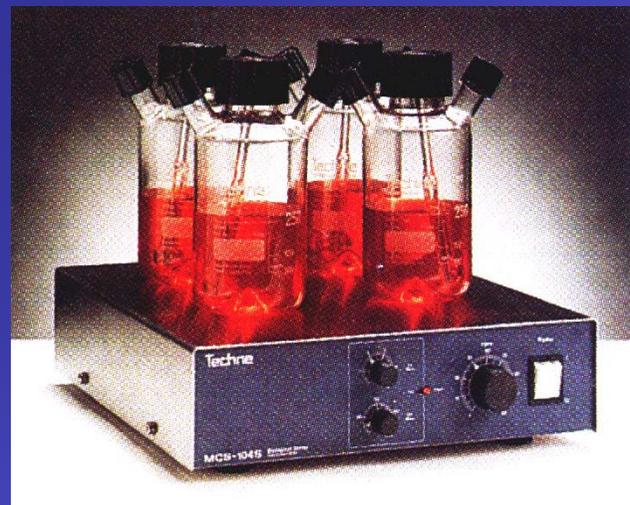
- ✓ Segunda perfusión con EDTA, 37°C
- ✓ Tercera perfusión con colagenasa tipo II, 37°C
- ✓ Disgregación mecánica

AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS PORCINOS

- ✓ Filtración por malla metálica (260 μ m)
- ✓ Centrifugación (50g), lavados
- ✓ Recuento y cálculo de viabilidad

CULTIVO DE LAS CÉLULAS AISLADAS

- ✓ Inóculo: $4-5 \times 10^6$ cél/ml
- ✓ Frasco con agitador magnético tipo pendular
- ✓ Agitación a 20-30rpm
- ✓ Incubación 37°C , 95% aire-5% CO_2 , 98% de humedad



AISLAMIENTO DE CÉLULAS

N° Células viables $5.000-23.000 \times 10^6$

Prom.cél.viables \pm DS $9.894,84\pm 5.018,59 \times 10^6$

Viabilidad $88,69\pm 8,80\%$

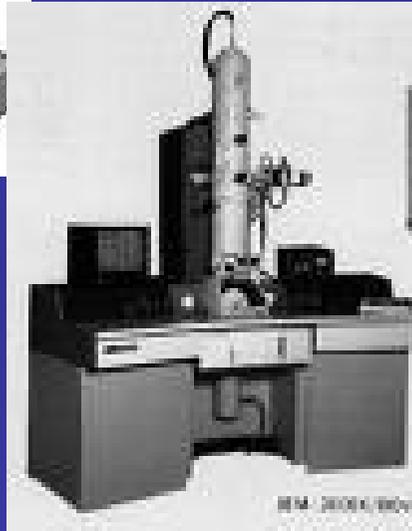
Tiempo de cultivo **2 a 6 días**

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LOS ESFEROIDES



Microscopía electrónica

Microscopía óptica



Microscopía electrónica de barrido (Esferoides de 48 hs)

- ✓ Estructuras compactas (100-150 μ m)
- ✓ Superficie lisa
- ✓ Presencia de poros de excreción

Microscopía electrónica de transmisión (Esferoides de 48 hs)

- ✓ Organelas celulares bien conservadas: Núcleo, Nucleolo, Mitocondria, Peroxisomas, Canalículos biliares con microvellosidades
- ✓ Presencia de complejos de unión: desmosomas, zonula adherens, uniones tight

Presencia de proteínas de matriz (Esferoides de 48 hs)

- ✓ Fibras de colágeno (por tricrómico de Masson)
- ✓ Fibras reticulares (por impregnación argéntica)

Presencia de células ductales biliares (Esferoides de 48 hs)

- ✓ Células Ck 19+ formando un ducto

Presencia de gránulos de glucógeno (Esferoides de 48 hs)

- ✓ Observados por microscopía electrónica y óptica (tinción de PAS)

Presencia de células proliferativas (Esferoides de 48 hs)

- ✓ Observados por incorporación de BrdU

APOPTOSIS Y NECROSIS

Esferoides de 2 días

Apoptosis
escasa

Necrosis
escasa

Esferoides de 6 días

Apoptosis
abundante

Necrosis en
core

Análisis de la funcionalidad de los esferoides

Capacidad de síntesis
(albúmina)

Capacidad de detoxificación
(diazepam, amonio)

Producción de ácidos biliares

Capacidad de síntesis: producción de albúmina

- ✓ Determinada por Western-blot
- ✓ Albúmina presente tanto en el sobrenadante del cultivo como en el intracelular

PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS BILIARES

(electroforesis capilar)

Ácido biliar	24 hs ($\mu\text{g/ml}$) (%)	48 hs ($\mu\text{g/ml}$) (%)
Ácido litocólico	140,0 (26)	81,4 (35)
Ácido quenodeoxicólico	66,9 (13)	54,6 (24)
Ácido glicolitocólico	244,0 (45)	70,5 (31)
Ácido taurolitocólico	48,0 (9)	11,7 (5)
Ácido glicocólico	39,8 (7)	11,7 (5)

Polaridad funcional de los esferoides: transporte de ácidos biliares

- ✓ Incubación con colil-lisil-fluoresceína (15, 30 y 60 min)
- ✓ A los 15 y 30 min acumulación del análogo en las uniones intercelulares

PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD DE LOS ESFEROIDES

- 1- In vitro (spinner)
- 2- En modelo simulador
- 3- En modelo animal de falla
hepática

FUNCIONALIDAD IN VITRO

- ✓ Producción de urea a partir de amonio
- ✓ Metabolismo de diazepam: producción de sus metabolitos (temazepam y oxazepam)

DESARROLLO DEL HÍGADO BIOARTIFICIAL

Etapas

- 1- Modelo simulador
- 2- Prueba en animales sanos
- 3- Puesta a punto del modelo de FHF
- 4- Prueba en animales en FHF

DESARROLLO DEL HÍGADO BIOARTIFICIAL (1° etapa)

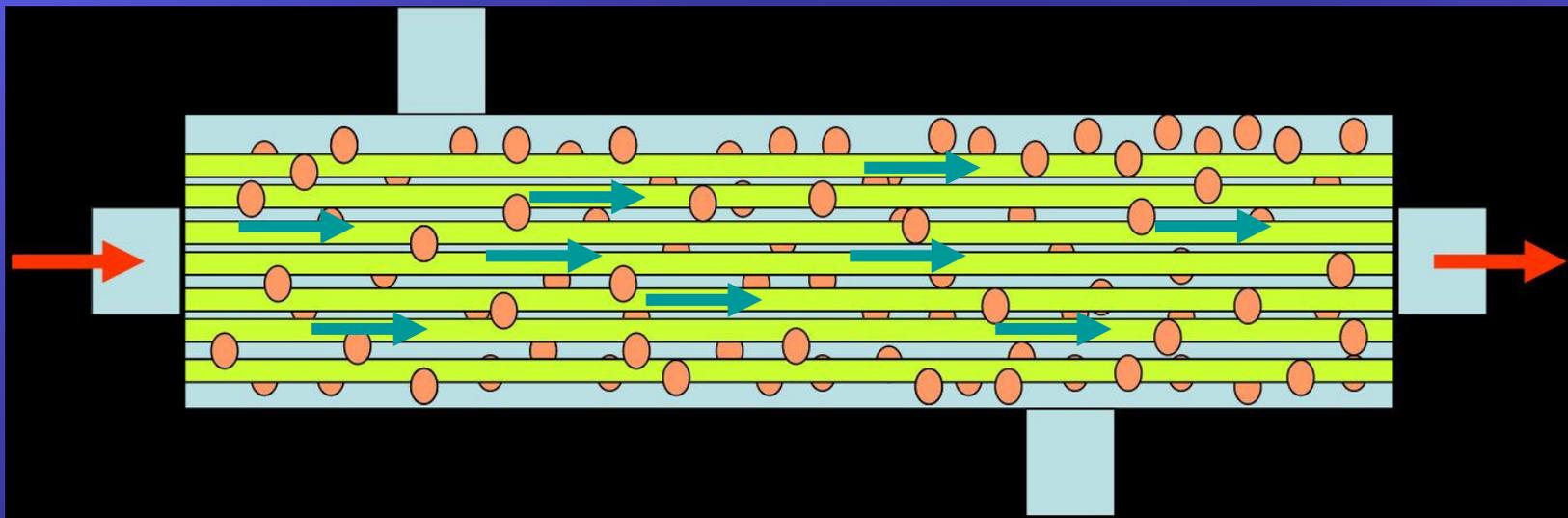
Modelo simulador

Tipo de soporte

- ✓ Fibra hueca
- ✓ Polisulfona (cut-off 50kDa)
- ✓ Esferoides de 48 hs
- ✓ Brazo mecánico

DESARROLLO DEL HÍGADO BIOARTIFICIAL (1º etapa)

Esquema del cartucho con esferoides



- Circulación de la sangre
- Esferoides
- Fibra capilar

1ª etapa: MODELO SIMULADOR

✓ Reservorio de cardiotoromía con sangre humana (diazepam y amonio)

Conexión al cartucho con esferoides de 48 hs

✓ Circulación (9 hs, 37°C)

MODELO SIMULADOR

Metabolismo de amonio

- ✓ Incubación con altas concentraciones de amonio
- ✓ Reducción de hasta un 70% a las 9 hs
- ✓ Producción de urea desde la hora 2 de circulación

Metabolismo de diazepam

- ✓ Producción de metabolitos

2ºetapa: DISPOSITIVO APLICADO A ANIMALES SANOS

- ✓ Cerdos de 10 kg sin patologías
- ✓ Conexión al dispositivo con esferoides de 48hs
- ✓ Circulación veno-venosa durante 6 hs
- ✓ Controles similares al modelo simulador

No hubo alteraciones significativas

3ª etapa: PUESTA A PUNTO DEL MODELO DE FHF

Modelo quirúrgico

- ✓ Cerdos de 8-12 kg sin patologías
- ✓ Anastomosis porto-cava
- ✓ Devascularización arterial del hígado
- ✓ Controles bioquímicos:
 - pre-quirúrgico
 - a las 0,3,24,48,96 hs
- ✓ Anatomía patológica al sacrificio/muerte

4ª etapa: DISPOSITIVO EN ANIMALES EN FHF

Secuencia del procedimiento

- ✓ Cerdos de 8-12 kg sin patologías previas
- ✓ Control bioquímico basal
- ✓ Colocación del sensor para PIC (encefalopatía hepática)
- ✓ Cánula de doble vía para la circulación
- ✓ Cirugía de FHF
- ✓ A las 5 hs (hiperamonemia y aumento de PIC),
conexión al dispositivo
- ✓ Control una vez por hora

4° etapa:
**DISPOSITIVO EN ANIMALES
EN FHF**

Observaciones

- 1- Disminución progresiva de amonio y PIC
- 2- Estabilidad de ambas variables hasta la desconexión, y aumento posterior

CRITERIOS PARA DECIDIR LA DESCONEXIÓN

1° Criterio

Descenso de PIC y amonio

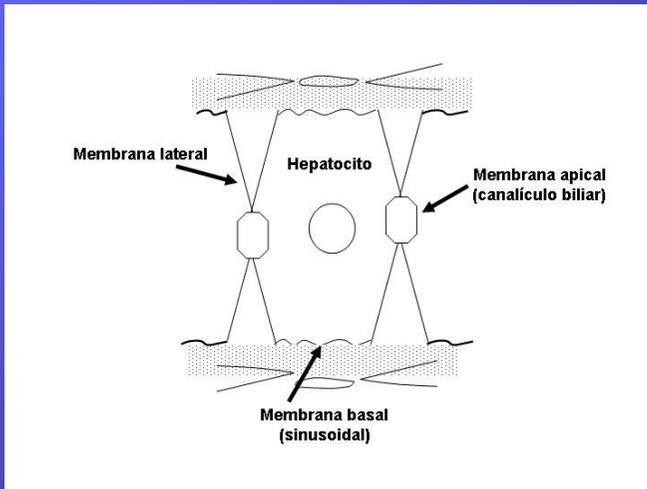


Aumento de ambos

2° Criterio

Después de 5 hs sin cambios en PIC y
amonio

Principales aportes de este modelo



✓ Los hepatocitos recuperaron su polaridad estructural original dentro de los esferoides

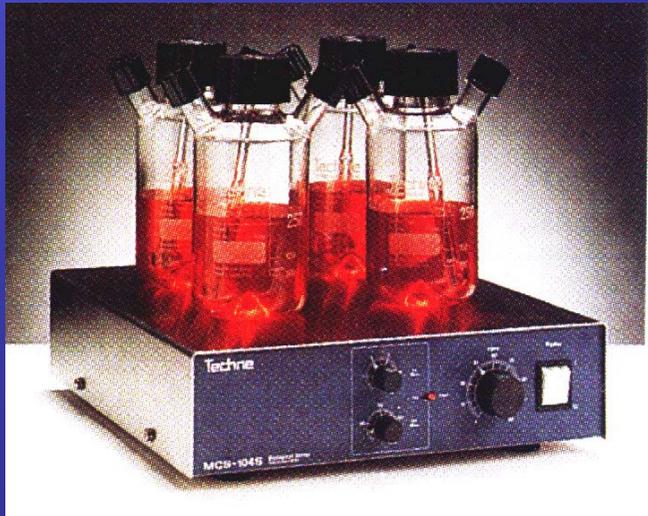
✓ Los esferoides fueron funcionales (capacidad de detoxificación y de síntesis)

✓ Puede ser llevado a escala clínica

EL FUTURO

Sistema de cultivo

- ✓ Burbujeo constante
- ✓ Control de flujo de gases
- ✓ Incubadora sobre la base magnética, con control de T
- ✓ Sistema automático para cambios de medio y cosecha



EL FUTURO

Equipo para aplicación clínica

- ✓ Tipo de Cartucho (Espacio extracapilar)
- ✓ Cantidad de cartuchos (serie o paralelo)
- ✓ Filtro de carbón activado?
- ✓ Sistemas de seguridad

CUÁL ES EL FUTURO DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS Y LA MEDICINA REGENERATIVA

Desarrollo de terapéuticas
mínimamente invasivas que
permitan restaurar las
funciones de órganos/tejidos
dañados

Proyecto de científicos y artistas ingleses

Biojoyería: joyas elaboradas a partir de células humanas

Fabricarán anillos de bodas con tejido de los futuros cónyuges

● Buscan promover el debate en torno de la ingeniería de tejidos ● Esa disciplina tiene como meta original la fabricación de órganos aptos para el trasplante

Anillos de bodas confeccionados a partir de células de hueso, previamente extraídas de los futuros cónyuges, serán el primer fruto de la llamada



ESTE NO ES PRECISAMENTE EL FUTURO DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

El objetivo de este proyecto -sin fines de lucro, según aclaran sus propulso-

Los tres estadios del desarrollo de un anillo a partir de tejido de hueso

Muchas gracias