



UNIVERSIDAD MODELO

Universidad Modelo
Escuela de Ingeniería
Ingeniería Biomédica

Fase 1. Avance

Asignatura: Proyectos

Nombre del Facilitador: Freddy Antonio Ix Andrade

Grupo: 6° Semestre IBM

Integrantes:

Andino Guerrero Josué Alejandro
Arias Rodríguez Alessa
Sánchez Madera Arely Claudette
Santos Soto Ilse Adalith

Mérida, Yucatán, México, a 19 de febrero del 2024

Índice

Marco teórico.....	2
Biorreactor.....	2
Transferencia de masa en un biorreactor.....	2
Estimulación mecánica y eléctrica de un biorreactor.....	2
Biorreactores tipo Tanque agitado.....	3
Biorreactores airlift.....	4
Cultivos in vitro.....	4
Requerimientos entorno y nutrimentales.....	4
Efecto hormético.....	5
Antecedentes.....	6
Diseño de Biorreactores Estimulantes.....	6
“Potenciamiento de la carotenogénesis en microalgas terrestres mediante el estrés de luz UV-A.” (Mutschlechner et al., 2022).....	6
“Aplicaciones de nueva tecnología de biorreactores para mejorar la viabilidad y función de células y tejidos cultivados.” (Hoyle et al., 2020).....	7
“Optimizando los biorreactores “todo en uno” al combinar perfusión intersticial, estimulación eléctrica, monitoreo en línea y pruebas dentro de una sola cámara para construcciones cardíacas” (Visone et al., 2018).....	8
“Desarrollo de un biorreactor con estimulación magnética y validación en un modelo de implante de piel artificial” (Jaramillo, et al, 2013).....	9
“Estandarización de cultivos de cardiomiositos neonatales en un biorreactor eléctrico para el desarrollo de tejido cardíaco” (Solano,2022).....	11
Biorreactores con efecto hormético.....	12
“Evaluación de nanotubos de carbono durante la multiplicación in vitro de caña de azúcar”.....	12
“La Respuesta Transcripcional Global de las Células Hepáticas Humanas al Estrés por Etanol de Diferente Intensidad Revela un Comportamiento Hormético”.....	13
“Exposición in vitro de stevia a nanopartículas de plata. (Castro, et al., 2018)”.....	14
“Monitoreo ultrasónico en biorreactor de cartílago en ingeniería humana en cultivo 3D” (Melchor et al., 2018).....	15
“Caracterización del flujo en un biorreactor de pared ondulada para ingeniería de tejido cartilaginoso.” (Bilgen et al., 2006).....	16
Bibliografía.....	17

Marco teórico

Biorreactor

Un biorreactor es un sistema cerrado con el fin de tener un entorno controlado y óptimo para que los microorganismos tengan un crecimiento y actividad adecuados. Es posible ajustar y monitorear ciertos parámetros como temperatura, concentración de oxígeno, nivel de pH, agitación y suministro de nutrientes, todo con el objetivo de proveer las mejores condiciones para la producción de las células o metabolitos deseados.

Transferencia de masa en un biorreactor

La transferencia de oxígeno y nutrientes, así como la eliminación de desechos metabólicos forman parte esencial del proceso que debe poseer un biorreactor. La ausencia de un sistema incapaz de lograr esto es un factor limitante para mantener la supervivencia celular del constructo. A comparación de los constructos madurados en un ambiente estático, los que se desarrollaron en uno donde se permite la transferencia efectiva de factores críticos han presentado una mejora en la microarquitectura celular. Este proceso se puede realizar principalmente mediante la difusión.

Así mismo, es de preferencia que el diseño del biorreactor tenga incorporados mecanismos para controlar el entorno físico y fisiológico, tales como la saturación de oxígeno, nivel de pH, temperatura, etc., para satisfacer las necesidades específicas de los tejidos o células.

Estimulación mecánica y eléctrica de un biorreactor

Algunos biorreactores pueden exponer a tejidos u otros elementos a cultivar a una variedad de fuerzas mecánicas en el mismo, incluyendo estiramiento, compresión y flujo hidrodinámico. Estas estimulaciones fungen un rol clave en la proliferación celular y la maduración de tejidos. Es de gran ayuda si el biorreactor es capaz de proporcionar señales fisiológicas biomiméticas para alcanzar las funciones deseadas de un tejido. El sistema de perfusión también permite una transferencia de masa eficaz de nutrientes y desechos.

La estimulación eléctrica se puede lograr al generar un campo eléctrico que atraviese el tejido o cultivo celular dentro de la cámara del biorreactor. Se ha demostrado una mejora en la maduración funcional y de tejidos a través de esta técnica, así como la combinación de estímulos eléctricos y mecánicos.

Biorreactores tipo Tanque agitado

Cuenta con un eje al que se acoplan una serie de palas con el objetivo de homogeneizar el contenido del biorreactor y generar una mejora en la difusión de gases en el medio de cultivo.

Dentro del tanque se genera un entorno controlado, y lo que favorece a este tipo de reactor es la versatilidad y capacidad de adaptarse a diferentes cultivos y condiciones de producción.

El hecho de que la agitación pueda ser controlada asegura una mezcla uniforme de nutrientes, homogeneidad de las variables intensivas a lo largo de todo el biorreactor.

Depende si es continuo agitado estacionario o dinámico al momento de utilizar la ecuación para calcular el concentrado inicial del reactivo.

Para un biorreactor estacionario es la siguiente:

$$CA = \frac{QCA_0}{Q + kV}$$

Donde:

CA₀ = concentración inicial del reactivo A

CA = concentración final del reactivo A

Q = flujo volumétrico alimentado

k = constante de velocidad de reacción

V = volumen del reactor de tanque agitado

Mientras que para uno dinámico cambia la concentración a la salida del reactor con respecto al tiempo, por lo que se modifica a la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{QCA_0 + kVCA_0 e^{-kt}}{Q + kV}$$

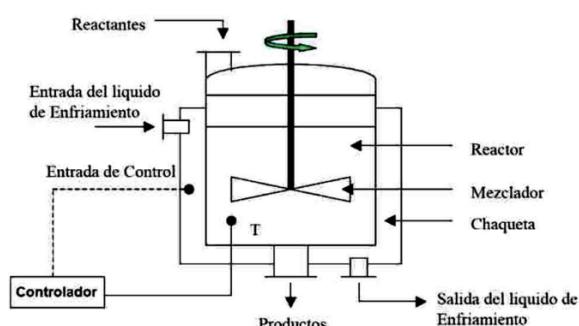


Imagen 1. Partes de un biorreactor tipo tanque agitado

Biorreactores airlift

Estos utilizan la circulación de burbujas de gas para mezclar el medio de cultivo y mantener en suspensión los microorganismos. Cuentan con dos secciones, la ascendente y la descendente, en el caso de la descendente el medio de cultivo vuelve a la parte inferior del tanque, lo cual completa el ciclo de circulación.

Sus ventajas son una buena transferencia de masa y calor, así como una mezcla suave y homogénea que evita el daño a microorganismos sensibles.

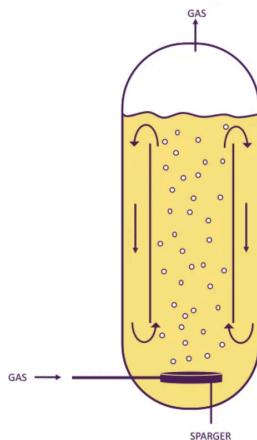


Imagen 2. Biorreactor airlift

Cultivos in vitro

Un cultivo in vitro es una técnica de cultivo celular en un entorno controlado y estéril dentro de un laboratorio. De esta forma se vuelve posible que las células crezcan y se reproduzcan fuera del organismo donde comúnmente viven para poder estudiar su comportamiento, realizar distintos tipos de pruebas como toxicidad y comprender sus procesos biológicos.

Es posible utilizar dos entornos de cultivo distintos:

- Placa petri: esta es un recipiente cilíndrico de vidrio o plástico, cuentan con una base y una tapa, esto proporciona un entorno estéril donde las células pueden crecer y ser observadas en un ambiente controlado.
- Microplaca: es una placa que contiene varios recipientes con forma de tubo, largo y delgado, que tiene el objetivo de almacenar una gran cantidad de muestras en un espacio reducido, además de generar una grana cantidad de pruebas utilizando un menor volumen de muestra

Requerimientos entorno y nutrimientales

Dependiendo del tipo de célula que se quiera cultivar, los requerimientos de entorno y nutricionales van a variar. Los que se pueden puntualizar son un ambiente estéril y controlado, con el objetivo de generar un entorno óptimo, medio de cultivo que proporcione los nutrientes necesarios dependiendo el tipo de célula, además de factores de crecimiento y hormonas que estimulan el desarrollo celular.

Otro punto importante a considerar es la composición del entorno, cada célula tiene una necesidad diferente y este debe ser ajustado para ser el mejor para la célula.

Efecto hormético

En el siglo XVI, el eminente químico y científico suizo Paracelso dejó una marca duradera en la historia de la ciencia con su célebre aforismo "La dosis hace el veneno". Esta expresión encierra un principio fundamental en la comprensión de la toxicidad de las sustancias, sugiriendo que incluso aquellas consideradas altamente tóxicas pueden ser toleradas por el cuerpo humano en dosis específicas. Sin embargo, más allá de su interpretación literal, esta afirmación resalta un principio más profundo: que tanto las sustancias beneficiosas como las perjudiciales pueden volverse peligrosas cuando se consumen en exceso.

Paracelso nos dejó un conocimiento crucial al destacar que la cantidad de una sustancia, ya sea venenosa o saludable, es un factor determinante en su efecto sobre el organismo. Este principio trasciende el ámbito de la química y la toxicología para abarcar otros aspectos de la vida, incluidos el estrés físico y emocional. En este contexto, surge la hormesis como un concepto biológico clave que ilustra cómo dosis controladas de estrés pueden tener efectos beneficiosos en el cuerpo humano. En lugar de considerar el estrés como intrínsecamente negativo, la hormesis reconoce que pequeñas dosis de estrés pueden desencadenar respuestas adaptativas que fortalecen al organismo y mejoran la salud general.

Este principio tiene amplias implicaciones en varios aspectos de la vida cotidiana. Por ejemplo, en el ámbito del ejercicio, se reconoce que el entrenamiento físico desafiante, aunque estresante para el cuerpo a corto plazo, puede conducir a mejoras significativas en la resistencia, la fuerza y la salud cardiovascular a largo plazo. De manera similar, en el ámbito de la nutrición, se comprende que ciertos compuestos, como los antioxidantes presentes en frutas y verduras, pueden proporcionar beneficios para la salud cuando se consumen en cantidades adecuadas, pero pueden volverse perjudiciales en exceso. Además, este principio se aplica incluso al ámbito del aprendizaje y la educación. El compromiso con estudios mentales intensivos y la exposición a desafíos intelectuales pueden ejercitar y fortalecer la mente, pero un exceso de estrés académico puede tener efectos adversos en el bienestar emocional y mental.

Antecedentes

Diseño de Biorreactores Estimulantes

“Potenciamiento de la carotenogénesis en microalgas terrestres mediante el estrés de luz UV-A.” (Mutschlechner et al., 2022).

El estudio tuvo como objetivo investigar el potencial de cinco cepas de microalgas terrestres para aumentar la producción de carotenoides cuando son expuestas al estrés de luz UV-A. Los carotenoides se encuentran entre los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, con amplias opciones de aplicación en la farmacología, la industria cosmética y de alimentos; de aquí surge el interés de diseñar un método para potenciar su producción, llegando a la implementación de un sistema inductor de estrés lumínico utilizando un sistema de irradiación basado en la tecnología de LED UV.

A partir de los precultivos de las microalgas, se llevó a cabo el cultivo de cada una en frascos de laboratorio de 1 L, que contenían 950 mL de 3N-BBM. Un puerto de una tapa roscada GL 45 con tubos de silicona permitía el intercambio de gases; un segundo puerto estaba conectado a una bomba de aire ProSilent para facilitar tanto la fumigación activa como la mezcla adecuada en el reactor. Igualmente, se utilizaron filtros de ventilación estériles Midisart 2000 PTFE, asegurando condiciones estériles durante el intercambio de gases.

Se diseñaron y fabricaron tres unidades de irradiación UV. Cada unidad constaba de un panel LED con dieciocho LEDs colocados en una placa de circuito impreso con núcleo de aluminio, los cuales estaban colocados en un arreglo de 6 x 3. Nueve de los LEDs emitieron luz UV-A con una longitud de onda nominal de 365 nm, y los nueve restantes una longitud de onda nominal de 375 nm. Una fuente de alimentación de corriente constante, se montó en la parte posterior de los paneles LED.

Igualmente, se adjuntan dos unidades laterales de ventilación F12 para eliminar el calor generado por los LEDs. Los paneles LED y los ventiladores se montaron en un marco modular de aluminio para permitir una posición reproducible de las unidades de irradiación UV en relación con los foto-biorreactores. La disposición final del biorreactor se puede observar en la **figura x**.



Imagen 3. Biorreactor con luz UV

A través de la fase de experimentación, se proporcionó evidencia de que el estrés lumínico UV-A puede ser efectivo para inducir rápidamente la carotenogénesis en microalgas terrestres y, por lo tanto, tiene un gran potencial para su explotación adicional en relación con la producción a gran escala de carotenoides.

“Aplicaciones de nueva tecnología de biorreactores para mejorar la viabilidad y función de células y tejidos cultivados.” (Hoyle et al., 2020).

El artículo se enfoca en el desarrollo de un sistema biorreactor pequeño y de bajo costo que supera algunos de los problemas de los sistemas de biorreactores típicos, al tiempo que mantiene una escala adecuada para la formación de tejidos complejos. Dichos problemas surgen junto al aumento de la complejidad de técnicas de cultivo celular, que viene acompañado de un costo en cuanto al tamaño del equipo necesario y los gastos asociados. La complejidad en las técnicas viene al momento de intentar recapitular correctamente las condiciones *in vivo* deseadas y, de esta manera, mejorar la viabilidad, función y relevancia fisiológica de las células cultivadas; estas técnicas suelen introducir la perfusión del medio de cultivo celular para replicar el entorno dinámico *in vivo*.

El biorreactor fue diseñado para funcionar utilizando un agitador magnético para generar un flujo dinámico del medio. Se diseñó un soporte esférico de poliestireno para alojar una membrana porosa sobre la cual se podrían cultivar las células o mantener cortes de tejido. Se utilizaron membranas Alvetex en el sistema para soportar el cultivo celular debido a la naturaleza altamente porosa de las mismas.

Para sostener el soporte esférico, se diseñó un cono ventilado que actúa como deflector para la turbulencia creada por el agitador, mientras que las aberturas inclinadas generan un patrón efectivo de recirculación del medio; este se hizo de politetrafluoroetileno (PTFE), un polímero altamente inerte y biocompatible. Este sistema se encuentra en un vaso de precipitados, con una tapa de poliestireno poco ajustada para permitir una adecuada difusión de gases. Para facilitar la agitación, se utilizó una barra magnética de agitación y el aparato se colocó en un agitador magnético. El esquemático del sistema completamente ensamblado se muestra en la **imagen 4**.



Imagen 4. Esquema del sistema

Para la etapa experimental, el sistema fue probado con tres poblaciones celulares: El cultivo de células de carcinoma hepatocelular, donde se observó una estructura mejorada y una función metabólica básica; el cultivo de células madre pluripotentes humanas, en el cual los cultivos formaron tejidos más heterogéneos que se asemejan al teratoma *in vivo*; y en cortes de tejido hepático *ex vivo*, donde se observó una mejora en el mantenimiento de la viabilidad celular durante los tres días de prueba.

“Optimizando los biorreactores “todo en uno” al combinar perfusión intersticial, estimulación eléctrica, monitoreo en línea y pruebas dentro de una sola cámara para construcciones cardíacas” (Visone et al., 2018)

La publicación explica el proceso del diseño de una cámara de cultivo fungiendo como biorreactor que proporciona a construcciones cardíacas tridimensionales con perfusión intersticial bidireccional y estimulación eléctrica biomimética, y así mismo permitiendo un monitoreo óptico celular directo y pruebas de contractilidad. Las estrategias de ingeniería de tejidos se han explotado ampliamente para generar parches cardíacos funcionales. Se han diseñado biorreactores para proporcionar perfusión y estimulación eléctrica, ya sea de forma individual o combinada. Como adición, este artículo explica la implementación de sistemas ópticos para monitoreo celular.

El diseño de la cámara consta del soporte del andamio y un conector para los cambios de medio, conectados a través de un tubo de silicona curada con platino oxigenante, de modo que forman un toroide. La cámara se montó en una plataforma oscilante que se mueve en ambas direcciones a lo largo de un eje perpendicular al bucle, produciendo convección del medio a través del andamio. La cámara de cultivo es completamente transparente: las partes estructurales se realizaron en polidimetilsiloxano (PDMS), y se integraron dos ventanas de vidrio para lograr imágenes de alta definición. El soporte del andamio es donde se albergan los electrodos, responsables de la estimulación eléctrica. Estos fueron realizados con acero inoxidable AISI 316L. El conector para cambios de medio también se realizó en PDMS para sellar un conector de bloqueo dentro del tubo. Igualmente, se utilizaron discos de soporte impresos en 3D conectados a la plataforma oscilante mediante dos conectores magnéticos. La cámara de cultivo biorreactor implementada se muestra en la **img. 5**.



Imagen 5. Cámara de cultivo

Para la etapa de experimentación, fibroblastos cardíacos de ratas neonatales fueron sometidos a una combinación de perfusión y estimulación eléctrica. Las células fueron eléctricamente estimuladas y estuvieron en perfusión en un lapso de siete días tras haber sido precultivadas. El campo eléctrico generado a través de los electrodos fue de 5 V/cm, con patrones de pulsos de 1 Hz. Los resultados mostraron una viabilidad celular positiva a lo largo del tiempo; La combinación de perfusión y estimulación eléctrica mejoró la maduración de los parches, como lo evidencian la mayor contractilidad, las propiedades mejoradas de latido y el aumento en el nivel de expresión de proteínas cardíacas.

“Desarrollo de un biorreactor con estimulación magnética y validación en un modelo de implante de piel artificial” (Jaramillo, et al, 2013)

A lo largo de la investigación se describe minuciosamente la concepción y ejecución de un sistema biorreactor enlazado a un sistema de generación de campo magnético controlado y espacialmente localizado. Este sistema emite una señal uniforme, de baja frecuencia seleccionable, de baja magnitud ajustable y con temporización controlada, con el propósito de examinar la viabilidad y la proliferación de cultivos celulares matriciales *in vitro* durante su desarrollo y crecimiento, bajo la influencia de campos magnéticos de extrema baja intensidad y frecuencia.

El objetivo principal del estudio consistió en diseñar y desarrollar un biorreactor de matriz celular, insertado dentro de un sistema de estimulación electromagnética externa, que se adecuara al diseño experimental para el cultivo *in vitro* de células humanas normales. Esto permitiría exponerlas a radiación por campos magnéticos de baja frecuencia, lo que posibilitará la estimación de las variables eléctricas inducidas y la correlación de estas con los efectos observados en el comportamiento biológico.

Para llevar a cabo la investigación, se implementaron una serie de pasos cruciales, entre los cuales destacan los siguientes:

- Desarrollo de un biorreactor: Se optó por emplear un biorreactor giratorio con flujo laminar, debido a su capacidad para el intercambio constante de nutrientes y la eliminación de productos metabólicos, condiciones indispensables para mantener la viabilidad de la matriz celular durante la experimentación.
- Creación de un sistema estimulador magnético: Se modificó un prototipo existente de un sistema electrónico programable para generar ondas sinusoidales con frecuencias entre 5 y 105 Hz y magnitudes de intensidad seleccionables de hasta 10 mT. Este sistema produjo un campo magnético homogéneo distribuido espacialmente, gracias a actuadores electromagnéticos específicamente diseñados para este propósito.
- Obtención de la densidad celular requerida para la validación *in vitro*: Se empleó una línea celular de fibroblastos de piel humana normal, almacenada en termos con nitrógeno líquido.
- Integración del biorreactor, el estimulador, los medios nutritivos y el cultivo celular: Las células se sembraron en una matriz porosa con el objetivo de generar un complejo celular tridimensional y facilitar la nutrición a través de la matriz. El biorreactor se diseñó con características dinámicas específicas para optimizar el crecimiento *in vitro* de las matrices celulares.

Se llevó a cabo un análisis exhaustivo basado en los resultados obtenidos con la metodología descrita. Se evaluó el comportamiento del crecimiento de células humanas normales en la matriz dentro del biorreactor, sometidas a radiación por campos magnéticos de baja frecuencia. Se elaboró un modelo computacional correspondiente al diseño experimental *in vitro*, lo que permitió estimar las variables eléctricas inducidas y establecer relaciones entre la señal generada, la señal inducida y los efectos de proliferación.

Tras realizar pruebas de citotoxicidad y evaluar la viabilidad y la formación de relaciones entre las tasas de crecimiento y los mecanismos celulares, se utilizaron los resultados para determinar el estado fisiológico y bioquímico de las células. Se concluyó que la formación exitosa de matrices de tejidos celulares indica viabilidad biológica y la posibilidad de desarrollar un sustituto de piel. Como trabajo futuro, se propone caracterizar mecánicamente el tejido obtenido, replicar el proceso para obtener mayores densidades y realizar validaciones en animales.

“Estandarización de cultivos de cardiomiositos neonatales en un biorreactor eléctrico para el desarrollo de tejido cardíaco” (Solano,2022)

El propósito de este trabajo fue estandarizar dos aspectos cruciales en el cultivo de cardiomiositos de rata neonatal: el primero, en andamios de alginato/quitosano para el desarrollo de tejido muscular cardíaco *in vitro*; y el segundo, en un biorreactor con diversos estímulos eléctricos.

La estimulación eléctrica desempeña un papel fundamental en el establecimiento de conexiones célula-célula entre los cardiomiositos, fomentando la actividad electrofisiológica y generando contracciones uniformes similares a las del tejido cardíaco nativo. Por otro lado, la estimulación mecánica contribuye a mantener contracciones uniformes y favorece una morfología celular alargada, semejante a las células del tejido cardíaco nativo.

Los biorreactores electromecánicos representan una opción integral, ya que aplican estímulos eléctricos y mecánicos simultáneamente. Los biorreactores eléctricos pueden inducir estimulación directa o indirecta: en el primer caso, los electrodos están en contacto directo con el constructo, mientras que en el segundo, el estímulo proviene de un campo electromagnético generado por bobinas o barras de metal conductor.

El estimulador eléctrico ofrece la posibilidad de aplicar pulsos eléctricos con valores ajustables de voltaje (1-10 V), frecuencia (1-10 Hz), ancho de pulso (1-10 ms) y corriente (1-20 mA). Por ejemplo, la estimulación eléctrica con determinados parámetros, como 3 V, 3 Hz, y 2 ms, promueve un mayor crecimiento del tejido muscular cardíaco, con una expresión de proteínas cardíacas superior a los cultivos sin estimulación eléctrica.

Se generaron tres tipos de constructos en cinco cultivos independientes, cada uno con condiciones específicas de cultivo: estático, con perfusión, y con perfusión y estimulación eléctrica. Tras realizar la estimulación, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Un flujo de perfusión con un esfuerzo cortante inferior al máximo tolerado por las células cardíacas ($1.9 \text{ dina/cm}^2 < 2.4 \text{ dina/cm}^2$) favorece la formación de esferoides de mayor tamaño con mayor expresión de TPM.
- Pulsos eléctricos de 5 V, 1 Hz, 2 ms ayudan a generar esferoides cardíacos tres veces más grandes que pulsos eléctricos de 3 V, 3 Hz, 2 ms ($1594 \pm 275.9 \mu\text{m}^2$ Vs $572 \pm 73 \mu\text{m}^2$).
- El cultivo con perfusión y estimulación eléctrica (5 V, 1 Hz, 2 ms) genera esferoides cardíacos con un tamaño medio de $1979 \pm 325.1 \mu\text{m}^2$ y una expresión de TPM de 62601 ± 9413 intensidad total/ μm^2 , valores más grandes que los generados sin estimulación eléctrica.

En resumen, este estudio proporciona importantes hallazgos sobre los efectos de la estimulación eléctrica y la perfusión en el cultivo de cardiomiositos, lo que podría tener implicaciones significativas en el desarrollo de tejido muscular cardíaco *in vitro*.

Biorreactores con efecto hormético

“Evaluación de nanotubos de carbono durante la multiplicación in vitro de caña de azúcar”

Los nanotubos de carbono en la agricultura han sido de gran importancia para el desarrollo de la civilización debido a todas las dificultades a las que se enfrenta el sector agrícola.

La nano biotecnología y la nano agricultura han llegado a ser de gran beneficio aumentando la biomasa foliar, estimulando el desarrollo vegetal y el efecto hormético.

Se utilizó un biorreactor de inmersión temporal para la multiplicación, es rápido, económico y eficiente, además de generar plantas de alta calidad. Promueve procesos fisiológicos como fotosíntesis, respiración, desarrollo de la clorofila y funcionamiento de los estomas.

La administración de diferentes concentraciones de NTCPM tuvo un efecto contrastante sobre el número de brotes por explante, longitud de brote, número de hojas por brote, contenido de clorofila, porcentaje de materia seca y porcentaje de carbono en brotes de caña de azúcar cultivados en BIT. La mayor cantidad de brotes se obtuvo en las concentraciones de 100 y 200 mg L⁻¹ de NTCPM, con 38.33 y 37.93 brotes por explante, respectivamente; mientras que, la menor cantidad de brotes se observó en el tratamiento control, con 26.06 brotes por explante.

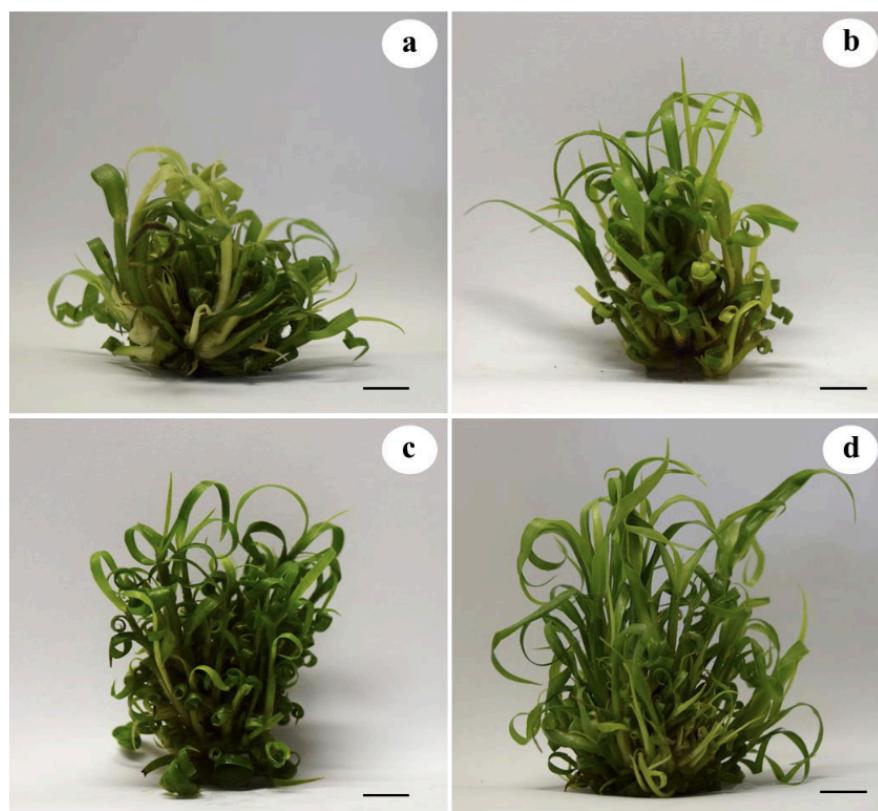


Imagen 6. Efecto de diferentes concentraciones de NTCPM en el desarrollo de brotes in vitro de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) cv. Mex 69-290 a los 30 días en inmersión temporal; a-d) 0, 50, 100, y 200 mg L⁻¹de NTCPM, respectivamente. Barra = 1 cm.

“La Respuesta Transcripcional Global de las Células Hepáticas Humanas al Estrés por Etanol de Diferente Intensidad Revela un Comportamiento Hormético”

En este estudio, se examinó la respuesta *in vitro* de las células hepáticas humanas a diversas concentraciones de etanol (EtOH) utilizando un dispositivo de hígado bioartificial perfundido que simula la estructura del órgano natural.

Se cultivaron células hepáticas humanas primarias en el dispositivo y se trataron con diferentes concentraciones de EtOH (150 mM, 300 mM o 600 mM) durante 24 horas, mientras que un grupo de control permaneció sin tratar. Se utilizó el chip Affymetrix Human Gene 1.0 ST Gene para monitorear los patrones de expresión génica, y los genes expresados diferencialmente (DEGs) se agruparon utilizando el algoritmo Fuzzy c-means. Además, se aplicaron métodos de clasificación funcional, mapeo de vías KEGG y un enfoque de aprendizaje automático (Random Forest).

Se identificaron 966 DEGs a 150 mM de EtOH, 1,334 a 300 mM y 4,132 a 600 mM. Las relaciones dosis-respuesta de los DEGs mostraron comportamientos monotónicos, umbral o no monotónicos (horméticos). La clasificación funcional reveló que concentraciones bajas o medias de EtOH indujeron procesos de adaptación, mientras que concentraciones altas reflejaron daño celular. Los genes con respuesta hormética estaban relacionados con "metabolismo cetónico celular" y "metabolismo de ácidos carboxílicos". La expresión alterada de genes como BAHD1 y H3F3B fue suficiente para clasificar las muestras según las dosis de EtOH.

La exposición al EtOH afectó diversas vías metabólicas y epigenéticas, algunas de las cuales experimentaron una regulación hormonal en el dispositivo de hígado bioartificial. Los cambios observados a concentraciones altas de EtOH reflejan aspectos de la hepatitis alcohólica en humanos.

“Exposición in vitro de stevia a nanopartículas de plata. (Castro, et al., 2018)”

En el pasado, la nanotecnología experimentó un crecimiento exponencial, impregnando diversos campos científicos y tecnológicos, incluyendo la agricultura. Entre las aplicaciones más prometedoras de la nanotecnología en este sector se encontró el uso de nanopartículas (NPs) para mejorar la producción y calidad de los cultivos.

En este contexto, un estudio se centró en evaluar el impacto de las nanopartículas de plata (NPsAg) en la respuesta fisiológica de la *Stevia rebaudiana* B., una planta de gran interés por sus propiedades edulcorantes y medicinales. Se llevó a cabo un estudio in vitro utilizando segmentos nodales de la planta cultivados en medio Murashige and Skoog (MS) suplementado con diferentes concentraciones de NPsAg (0, 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/L). El estudio se centró en utilizar segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* B con dos brotes que fueron cultivados y suplementados por con diferentes concentraciones de NPsAg y después de 30 días de crecimiento se procedió a una evaluación.

Dentro de esta evaluación se contabilizó los brotes nuevos que se generaron a partir de cada explante, la longitud del crecimiento de los mismos después de cada explante y la concentración de clorofila presente en las hojas. El desarrollo de nuevos métodos para caracterizar e identificar NPsAg en células y tejidos contribuiría a una mejor comprensión de los efectos potenciales durante el cultivo in vitro de tejidos vegetales. A la fecha, se han utilizado técnicas de microscopía para estudiar la asimilación y acumulación de NPs en plantas bajo condiciones in vitro.

Los resultados del análisis por microscopía multifotón confirmaron la presencia de NPsAg en diferentes tejidos de la stevia (**Imagen 7**). Se observó que la concentración de NPsAg influía en su ubicación dentro de las células, con una mayor acumulación en los espacios intercelulares a altas concentraciones. El cultivo de tejidos vegetales (CTV) implica el cultivo aséptico de células, tejidos u órganos en un medio nutritivo controlado in vitro. Estas técnicas, enfocadas en las células, se han adaptado para especies silvestres con desafíos en la propagación convencional o con poblaciones muy reducidas.

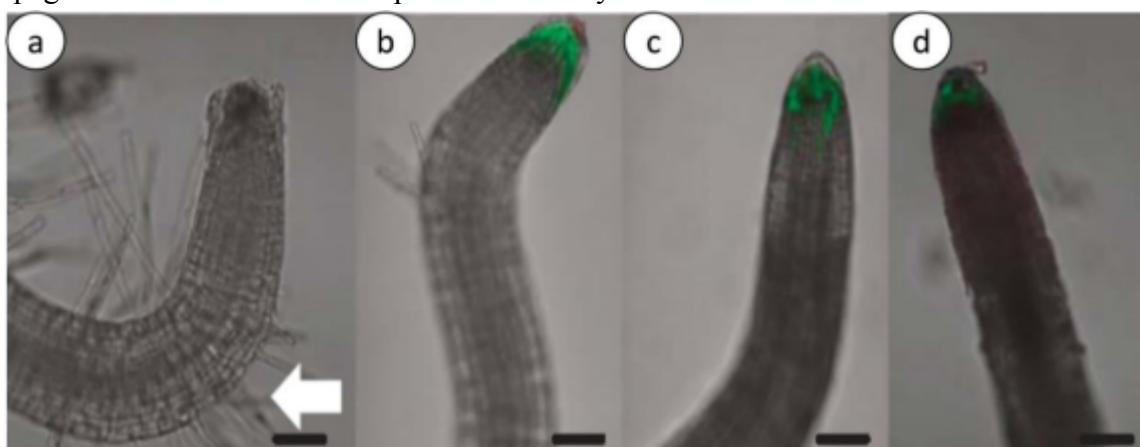


Imagen 7. Presencia de NPsAg en tejidos de stevia

“Monitoreo ultrasónico en biorreactor de cartílago en ingeniería humana en cultivo 3D” (Melchor et al., 2018)

En el marco de la investigación previa en ingeniería de tejidos cartilaginosos, el estudio se emprendió con el propósito de desarrollar un biorreactor destinado a monitorear la formación de tejido neocartilaginoso mediante la aplicación de señales ultrasónicas. Para ello, se usaron andamios de ácido poliláctico (PLA) impresos en 3D, los cuales fueron sembrados con condrocitos humanos y cultivados en un biorreactor integrado con tecnología ultrasónica. La monitorización ultrasónica permitió la inferencia de la evolución de la matriz extracelular (MEC) mediante la aplicación de modelos numéricos y técnicas estocásticas, validando los resultados con mediciones *in vitro*.

Este enfoque de monitoreo no invasivo destacó su utilidad en la ingeniería de tejidos cartilaginosos en 3D al proporcionar información valiosa sobre la proliferación celular y la formación de la ECM. Además, se exploraron correlaciones significativas entre la expresión de glicosaminoglicanos (GAG) y colágeno II (Col II) con la amortiguación elástica de la nueva ECM, consolidando la viabilidad del uso de ultrasonido en este contexto.

La combinación de biorreactores y ultrasonidos se postuló como un enfoque prometedor para realizar estudios biomecánicos y bioquímicos en entornos 3D. Este estudio resaltó la importancia de comprender y manipular los procesos celulares en cultivos 3D, especialmente en relación con la desdiferenciación de condrocitos, una preocupación clave en terapias regenerativas para defectos en el cartílago articular. Además, se expone la relevancia del aislamiento y cultivo de condrocitos articulares humanos en el desarrollo de terapias regenerativas, subrayando la necesidad de investigaciones más profundas en este ámbito.

En condiciones de estrés leve, los ultrasonidos suelen estimular la proliferación celular, la producción de proteínas y la expresión de genes. Los ultrasonidos también pueden mejorar la permeabilización de la membrana celular, lo que facilita la entrada de nutrientes y la salida de productos de desecho (**Imagen 8**).

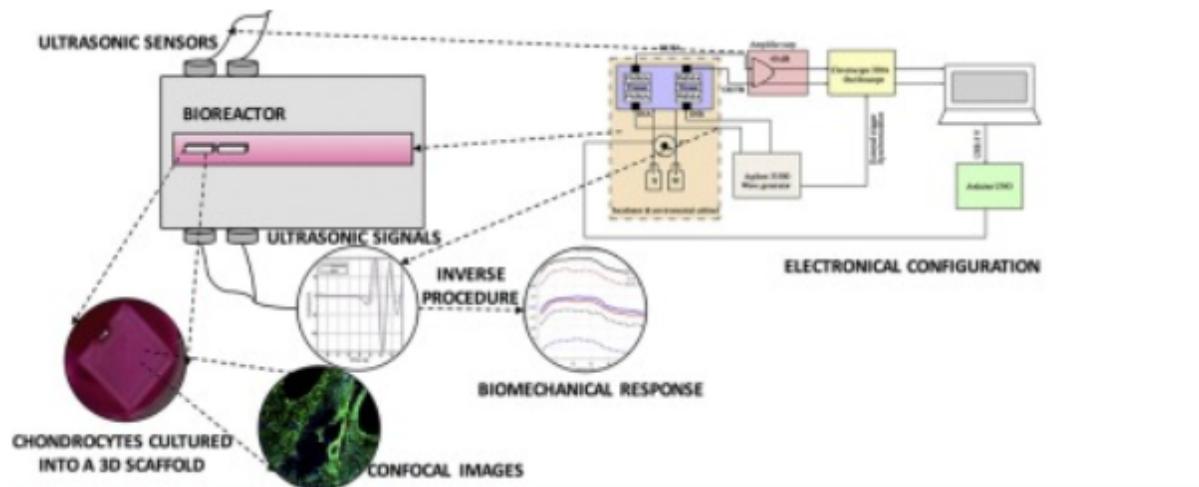


Imagen 8. Esquema beneficio de ultrasonido

“Caracterización del flujo en un biorreactor de pared ondulada para ingeniería de tejido cartilaginoso.” (Bilgen et al., 2006)

El estudio se centró en la problemática de la artritis, que afecta a 70 millones de estadounidenses según el informe de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2002). Los tratamientos tempranos actuales, como terapias farmacológicas y físicas, tratamientos intraarticulares e implantación de condrocitos autólogos cultivados, no logran restablecer completamente las propiedades estructurales y funcionales del cartílago, lo que puede llevar a consecuencias graves como la artroplastia total de la articulación. En este contexto, la implantación de cartílago cultivado en tejido es una aproximación prometedora.

Los constructos de cartílago cultivados en tejido generalmente se producen cultivando condrocitos en andamios de polímeros biodegradables en biorreactores. Estos andamios proporcionan un entorno tridimensional para la adhesión de condrocitos y la deposición de la matriz extracelular (MEC). Los biorreactores, por su parte, son cruciales para el transporte de gases y nutrientes entre los condrocitos y el medio de cultivo, así como para suministrar estímulos mecánicos necesarios para la síntesis de la MEC.

A pesar de su amplio uso, los biorreactores actuales, como los frascos giratorios y los biorreactores perfundidos, no logran producir construcciones que igualen las propiedades bioquímicas y mecánicas del cartílago nativo. Una de las limitaciones clave radica en la insuficiente secreción de componentes de la MEC, especialmente el colágeno tipo II.

El estudio destaca que, además del entorno bioquímico, las cargas hidrodinámicas y mecánicas también regulan la morfología y composición del tejido. Sin embargo, aún no se comprenden completamente los mecanismos y señales mediante los cuales las fuerzas externas aplicadas afectan las propiedades del tejido. Para mejorar el diseño de los biorreactores y las condiciones de funcionamiento, así como para facilitar el crecimiento de tejido cartilaginoso clínicamente relevante, es fundamental caracterizar el entorno hidrodinámico generado *in vitro* y establecer relaciones entre las propiedades estructurales de los constructos de cartílago y las fuerzas mecánicas que actúan sobre ellos.

Se mencionan diversas investigaciones que relacionan el crecimiento celular o el daño celular con propiedades hidrodinámicas como la tensión de corte en cultivos de células en suspensión y microportadores. Sin embargo, pocas investigaciones se han centrado en caracterizar el entorno hidrodinámico en sí mismo modelando el flujo en biorreactores y cuantificando las fuerzas hidrodinámicas asociadas.

La investigación propone el uso de técnicas experimentales de velocimetría, como la anemometría láser-Doppler (LDA), la velocimetría de imágenes de partículas (PIV) y la velocimetría de seguimiento de partículas (PTV), para caracterizar el campo de flujo dentro del biorreactor de pared ondulada (WWB). Este biorreactor ha demostrado ser efectivo para aumentar la densidad celular en cultivos con microportadores, fomentar la formación de agregados de condrocitos y mejorar la proliferación celular y la deposición de la MEC en construcciones de cartílago. El flujo en el WWB se midió y comparó con el obtenido en el frasco giratorio estándar.

Bibliografía

Aguirre, G., Calle, M., & Pierre, J. (s. f.). Aspectos generales de cultivo in vitro.

Bilgen, B., Sucosky, P., Neitzel, G. P., & Barabino, G. A. (2006). Flow characterization of a wavy-walled bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biotechnology And Bioengineering*, 95(6), 1009-1022. <https://doi.org/10.1002/bit.20775>

Castro González, C. G. (2018). EXPOSICIÓN in vitro DE ESTEVIA (Stevia rebaudiana B.) A NANOPARTÍCULAS DE PLATA: TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN. [Tesis de maestría, Colegio de postgraduados]. [http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/3286/Castro_Gonzalez\(CG\)_MC_Innovacion_Agroalimentaria_Sustentable_2018.pdf?sequence=1](http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/3286/Castro_Gonzalez(CG)_MC_Innovacion_Agroalimentaria_Sustentable_2018.pdf?sequence=1)

Cultivo in vitro de células y tejidos vegetal | Intagri S.C. (s. f.). <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>

Francisco Solano. (2022). Estandarización de cultivos de cardiomiositos neonatales en un biorreactor eléctrico para el desarrollo de tejido cardiaco. <http://ilitia.cua.uam.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/1122/1/ESTANDARIZACI%C3%93N%20DE%20CULTIVOS%20DE%20CARDIOMIOCITOS.pdf>

Garcia Morales, M. (2021). Evaluación de nanotubos de carbono durante la multiplicación in vitro de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Cv. MEX 69-290) en inmersión temporal. COLEGIO DE POSTGRADUADOS.

Hoyle, H. W., Smith, L. A., Williams, R. J. P., & Przyborski, S. (2020). Applications of novel bioreactor technology to enhance the viability and function of cultured cells and tissues. *Interface Focus*, 10(2), 20190090. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2019.0090>

Lim, D., Renteria, E. S., Sime, D. S., Ju, Y. M., Kim, J. H., Criswell, T., Shupe, T., Atala, A., Marini, F. C., Gürcan, M. N., Söker, S., Hunsberger, J., & Yoo, J. (2021). Bioreactor design and validation for manufacturing strategies in tissue engineering. *Bio-Design And Manufacturing*, 5(1), 43-63. <https://doi.org/10.1007/s42242-021-00154-3>

Melchor, J., López-Ruiz, E., Soto, J. M. S., Jiménez, G., Antich, C., Perán, M., Baena, J. M., Marchal, J. A., & Rus, G. (2018). In-bioreactor ultrasonic monitoring of 3D culture human engineered cartilage. *Sensors And Actuators B: Chemical*, 266, 841-852. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.152>

Mutschlechner, M., Walter, A., Colleselli, L., Griesbeck, C., & Schöbel, H. (2022). Enhancing carotenogenesis in terrestrial microalgae by UV-A light stress. *Journal Of Applied Phycology*, 34(4), 1943-1955. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02772-5>

Pinedo Jaramillo, C. R., Cadavid Ramírez, H., Gutiérrez Montes, J. O., Criollo Gómez, W. D., Martínez Guerrero, L. J., Restrepo, A. F., ... & Cardozo Londoño, J. (2013) " Desarrollo de un biorreactor con estimulación magnética y validación en un modelo de implante de piel artificial".

<https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/server/api/core/bitstreams/76bc4d88-367f-46b0-a759-98440464742a/content>

Schmidt-Heck, W., Wönne, E. C., Hiller, T., Menzel, U., Koczan, D., Damm, G., Seehofer, D., Knöspel, F., Freyer, N., Guthke, R., Dooley, S., & Zeilinger, K. (2017). Global Transcriptional Response of Human Liver Cells to Ethanol Stress of Different Strength Reveals Hormetic Behavior. *Alcohol: Clinical & Experimental Research*, 41(5), 883-894. <https://doi.org/10.1111/acer.13361>

Visone, R., Talò, G., Lopa, S., Rasponi, M., & Moretti, M. (2018). Enhancing all-in-one bioreactors by combining interstitial perfusion, electrical stimulation, on-line monitoring and testing within a single chamber for cardiac constructs. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35019-w>